



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA  
DEL CARCINOMA HIPOFARÍNGEO (FADU)**

**TRATADO CON NOBILETINA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ROBERTO LEÓN CONTRETAS ASTUDILLO**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: PROFESORA: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

**VOCAL: PROFESOR: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

**SECRETARIO: PROFESOR: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

**1° SUPLENTE: PROFESORA: AURORA LARA NÚÑEZ**

**2° SUPLENTE: PROFESOR: JAVIER AXOSCO MARIN .**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio de Bioquímica, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS**

**SUSTENTANTE:**

---

**ROBERTO LEÓN CONTRERAS ASTUDILLO**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la quiero dedicar al afecto, al sentimiento de apoyo, al gran esfuerzo que cada uno de mis familiares, amigos y compañeros tuvo sobre mi sin que ellos mismos supieran. Con personas que te miraran a los ojos cada día sonriendo y diciendo buenos días, me era imposible rendirme. Hubo desde personas que con la simple frase- ¡Que te diviertas! - mientras me dirigía a realizar experimentos de la tesis, hasta personas que día a día me preparaban un desayuno porque un cuerpo alimentado es un cuerpo que rinde.

No dudo que realizar una licenciatura en la UNAM sea de las experiencias más vivaces de mi vida, adjunto que me la pase mal en más de un tiempo, pero cada uno de los recuerdos de experiencias vividas en la UNAM me hace olvidarme de cada momento agobiante donde el transporte no se movía. Porque es así como nuestro consciente trabaja, recordando y amplificando buenos recuerdos y guardando los malos en el fondo, es así como no nos hundimos en un espiral eterna de desesperación y depresión, porque cada uno de los recuerdos felices nos hace querer más.

Nunca terminaré de agradecerles a mis familiares mi padre Roberto Contreras González, mi madre María Leonor Astudillo Castrejón y mi hermana Gabriela Conteras Astudillo. Esta es solo el comprobante escrito de que estoy en eterno agradecimiento con ustedes, porque nada que valga la pena se consigue fácilmente es el conocimiento que dieron.

Una mención especial a mi madre que en los días en que más triste me sentía, en los días en que más me quería rendir por eventos desafortunados, y solo ella me levanto para demostrarme cuan afortunado estoy por tener una madre tan maravillosa.

Agradecimientos a mis amigos y a las personas que dejaron de ser mis amigos, porque ahora que lo pienso todos ellos influyeron de manera positiva en mi actitud ante el mundo, me dejaron ver que en la humildad también hay mucha felicidad y que una sonrisa nunca cuesta.

Ahora veo cuan infeliz hubiera sido por no haber tenido amigos sensacionales, como Ángel Reza que nunca dejó de sonreír, como Laura Cristóbal que me apoyó en mi

manía por el Ultimate sin ver que en ella despertaba lo mismo, como Brenda por nunca negarme su amistad, como mis cuates del punto, y la verdad hay un sinfín de nombres por recordar y prefiero entrar en detalles sobre mi tema de tesis no mi vida.

### **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos de proporciones épicas a la profesora Gloria Gutiérrez Venegas que con sus ojos de color observa la verdad del mundo y con su amable sonrisa ilumina oscuros senderos de maleza por la que los estudiantes pasamos. No me jacto de ser una estudiante ejemplar, la verdad siempre he creído que puedo rendir más, y a pesar de eso no fue limitante para que un alma tan bondadosa invirtiera tiempo para mí. Gracias profesora, a pesar de que me pedía poesía, recuerde que usted misma es poesía. Una mención especial a el Señor Antonio González que despertó en mí el deseo de seguir cada vez que no me iban bien mis experimentos.

Agradecimiento especial a la Universidad Nacional Autónoma de México que gracias a ella logré crecer.

Confirmo que una institución te puede enseñar de todas las ciencias una vista cuadrada del pensamiento, afirmo que ninguna calificación será el potencial real de cada uno, pero propongo y me atrevo a defender que acudir a una escuela, evaluado por profesores que no sabes que tanto se esfuerzan por enseñarte, pero si sabes que tan buenos son, y obtener un papel donde diga que puedes ejercer tu carrera es un conjunto de experiencias que llevan detrás aprender a conocerte a ti. Me refiero a que una escuela te puede enseñar mucho; pero no puede enseñarte acerca de ti. Conocerse a uno mismo no es fácil, he llegado a lidiar conmigo mismo mas de una vez, pero la experiencia de la universidad me permitió conocer mis gustos, mi personalidad, mis debilidades y mis fortalezas. Aún no acabo de conocerme porque no conozco todo sobre el mundo y más de una cosa allá afuera podría interesarme. Pero afirmo que vivo feliz a pesar de no ser un premio nobel, vivo feliz a pesar de no ser millonario, vivo feliz porque a través de mis pupilas he apreciado la autonomía y experiencia que la universidad me permitió gozar.

<b>ÍNDICE</b>		<b>Página</b>
	Resumen.....	1
1	Antecedentes.....	2
1.1.	Reseña de la Terapéutica e investigación contra el cáncer.....	2
1.2	Incidencia y Mortalidad.....	5
1.3	Características clínicas del cáncer de hipofaringe.....	8
1.4	Factores de riesgo del cáncer hipofaríngeo.....	8
1.5	Signos y Síntomas.....	11
1.6	Diagnóstico.....	11
1.7	Terapéutica contra el cáncer.....	12
1.8	Prevención.....	13
1.9	Genética y epigenética del carcinoma de células escamosas ....	13
1.10	Sistema inmune y cáncer.....	16
1.11	Clasificación celular del cáncer de hipofaringe.....	17
1.12	Clasificación clínica.....	17
1.13	Proteínas celulares y su relación con el cáncer .....	19
1.14	Proteínas cinasa .....	19
1.15	Blancos contra el cáncer.....	21
1.16	Señalización intracelular de la proliferación.....	21
1.17	Vías de señalización PI3K/Akt.....	22
1.18	PTEN al rescate.....	24
1.19	Cascada debajo de PIP <sub>3</sub> : AKT.....	25
1.20	Efectos de AKT.....	26
1.21	Investigación científica vs cáncer.....	29
1.22	Productos naturales en la Terapéutica contra el cáncer.....	30
1.23	Estructura y actividad biológica de los flavonoides.....	32
1.24	Actividad biológica de la nobiletina.....	38
1.25	Metabolismo de la nobiletina.....	41
1.26	Línea celular FaDu de carcinoma escamoso hipofaríngeo.....	43
2	Justificación.....	44
2.1	Objetivo General.....	45

2.2	Objetivos particulares.....	45
2.3	Hipótesis.....	45
2.4	Materiales y métodos.....	46
2.4.1	Equipo.....	46
2.4.2	Reactivos.....	47
2.4.3	Programas de Cómputo.....	47
2.5	Metodología.....	47
2.5.1	Cultivo celular.....	47
2.5.2	Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	48
2.5.3	Tratamiento celular.....	48
2.5.4	Ensayo de Western Blot.....	48
2.5.5	Dilución de anticuerpos.....	50
2.5.6	Ensayo de migración celular cicatriz-herida.....	50
2.5.7	Ensayo de migración celular en cámara de Boyden.....	51
2.5.8	Extracción de mRNA.....	51
2.5.9	Reacción en cadena de la polimerasa-transcripción reversa RT-PCR.....	52
2.5.10	Ensayo de ELISA evaluando la producción de VEGF.....	52
2.5.11	Ensayo de TUNEL.....	53
2.5.12	Análisis estadístico.....	53
2.6	Resultados.....	53
2.6.1	Efecto de nobiletina sobre la viabilidad de la línea celular FaDu.	53
2.6.2	Efecto de nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu.	55
2.6.3	Efecto de nobiletina sobre la línea celular FaDu en la fosforilación de Akt/PI3K.....	57
2.6.4	Efecto de nobiletina sobre la fosforilación de ERK y JNK en la línea celular FaDu .....	58
2.6.5	Efecto de nobiletina sobre la expresión de PTEN en la línea celular FaDu.....	59
2.6.6	Efecto de nobiletina sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular FaDu .....	59

2.6.7	Efecto de nobiletina en la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por la línea celular FaDu.....	60
2.7	Discusión.....	62
2.8	Conclusiones.....	65
2.9	Expectativas a futuro .....	66
	Referencias.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Fig. 1 GLOBOCAN.....	5
Fig. 2 Muertes estimadas por cáncer a nivel mundial, ambos géneros, todas las edades, en todos los tipos de cáncer. CANCER TODAY.....	6
Fig. 3 Casos de cáncer América Latina en ambos géneros .....	7
Fig. 4 Récord de muertes en México por cáncer en la cavidad oral y faringe, todas las edades .....	8
Fig. 5 Cavidades.....	9
Fig. 6 Función de PI3K.....	22
Fig. 7 Activación de PI3K.....	23
Fig. 8 PTEN .....	24
Fig. 9. Estructura de las tres isoformas de AKT/PKB.....	25
Fig. 10 PI3K/AKT .....	26
Fig. 11 Funciones de AKT hasta el 2002 .....	29
Fig. 12 Apigenina.....	32
Fig. 13 Luteolina.....	33
Fig. 14 Baicaleína .....	33
Fig. 15 Quercetina.....	33
Fig. 16 Kaempferol .....	34
Fig. 17 Fisetina .....	34
Fig. 18 Narigenina .....	35
Fig. 19 Silibinina.....	35
Fig. 20 Taxifolina .....	36
Fig. 21 Genisteína.....	36

Fig. 22 Epigallocatequina-3-galato.....	37
Fig. 23 Delfinidina.....	38
Fig. 24 Nobiletina.....	38
Fig. 25 Efecto de nobiletina sobre la viabilidad de la línea celular FaDu..	54
Fig. 26 Efecto de nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu..	55
Fig. 27 Efecto de nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu..	56
Fig. 28 Efecto de la nobiletina la fosforilación de AKT/PI3K en sobre la línea celular FaDu.....	57
Fig. 29 Efecto de la nobiletina sobre la fosforilación de ERK y JNK en la línea celular FaDu.....	57
Fig. 30 Efecto de la nobiletina sobre la expresión de PTEN en la línea celular FaDu.....	59
Fig. 31 Efecto de Nobiletina sobre la formación de cuerpos apoptóticos en línea celular FaDu..	60
Fig. 32 Efecto de Nobiletina en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre la línea celular FaDu	61

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1. Genes con aberración epigenética de metilación en cáncer oral.....	15
Tabla 2. Sistema TNM para clasificación clínica de cáncer.....	18
Tabla 3. Efectos biológicos de Nobiletina en cáncer .....	41
Tabla 4. Dilución de anticuerpos primarios .....	50
Tabla 5. Dilución de anticuerpos secundarios.....	50

## RESUMEN

La terapéutica del cáncer se ha descrito desde antes de cristo en el papiro de Edwin con tratamientos paleativos. En la actual era de la medicina, el primer artículo publicado sobre la terapéutica del cáncer data de 1846 utilizando cirugías usando éter como anestésico, hasta desarrollarse el uso de elementos radiactivos en 1903 para tratar cáncer de piel, para después descubrir mejores métodos diagnósticos en 1928 se desarrolló la tinción de Pap en cáncer cervical, hasta promover la investigación de la terapéutica del cáncer utilizando agentes químicos, hasta desarrollar proyectos para contar y estimar el número de casos de cáncer impulsado por la Organización Mundial de la Salud por sus siglas en ingles WHO. Se piensa que este siglo XXI el humano no acabará de investigar todas las sustancias que puedan tener uso en la terapéutica contra el cáncer. El tratamiento del cáncer es recurrente en la población y se invierte un presupuesto gubernamental para tratarlo, de este modo, surge la necesidad de caracterizar el estado de células cancerígenas bajo el efecto de la mayor cantidad de fármacos esperando que alguno de ellos pueda tener un efecto útil en la terapéutica. Diversas investigaciones se han centrado en tratamientos alternativos como el uso de los flavonoides, que ya se han caracterizado por sus propiedades anti-carcinogénicas. El cáncer escamoso de cabeza y cuello, uno de los tipos de cáncer oral más severo, cuenta con un tratamiento adecuado cuando se detecta precozmente, pero ante alteraciones crónicas tiene baja prognosis. El estudio que se presenta tiene el propósito de evaluar el efecto del flavonoide nobiletina en la proliferación celular, migración y supervivencia en la línea celular proveniente de un carcinoma de células escamosas de hipofaringe. Utilizando el método de MTT para evaluar la viabilidad, Western Blot para caracterizar la vía PI3K/AKT, ERK y JNK en la proliferación celular, observando la migración por ensayo de cicatrización – herida y cámara de Boyden, evaluando la inducción de la angiogénesis por ELISA, la regulación de vías proliferativas por RT-PCR y la inducción de la apoptosis por ensayo de TUNEL todo bajo el efecto de este flavonoide. Encontramos que nobiletina disminuye la viabilidad celular, promueve expresión de genes involucrados en la inhibición de la proliferación,

promueve la apoptosis, disminuye la migración y altera a producción de factores de crecimiento. Los resultados señalan que nobiletina logra interactuar con las vías de señalización promotoras de la proliferación y demuestra que el flavonoide no tiene un sitio específico de acción. Su estructura podría servir como base para modificaciones y aumentar su selectividad para ayudar a la terapéutica contra el cáncer.

## **1 ANTECEDENTES**

### **1.1 Histórico de la terapéutica e investigación contra el cáncer.**

En las páginas actuales de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) [1] fundada en 1964 y el National Institute of Health (NIH) [2] fundado en 1937, se pone a disposición del público una amplia gama de sucesos pasados sobre la terapéutica del cáncer. Este apartado comprende datos históricos sobre la investigación del cáncer. El primer evento data de 1775 Percivall Pott identifica una relación entre la exposición a hollín de chimenea como factor ambiental que provoca carcinoma de células escamosas de escroto en limpiadores de chimenea, después en 1856 el dentista William T.G. Morton de Boston hace la primera demostración de anestesia general usando éter como anestésico para remover un tumor en cirugía, en 1863 Virchow vincula el cáncer con inflamación usando el término leucemia describiendo un exceso de glóbulos blancos en sangre. En 1886 se evidencia que el cáncer puede ser heredado de un padre a su hijo gracias al trabajo del oftalmólogo Brasileño Hilário de Gouvea sobre el retinoblastoma, en 1902 Theodor Boveri sugiere que los tumores se generan a partir de una sola célula con daño cromosómico, sorprendentemente el primer tratamiento de cáncer usando radiación fue hecho en 1903, cinco años después de que Marie Curie descubrió el radio; S.W. Globerg y Elfim London reportan el uso de este elemento radioactivo en dos pacientes de Rusia con cáncer de piel. Después se desarrolló la brachiterapia, en la cual se introducen elementos radioactivos al cuerpo. Posteriormente se descubrió que otras especies como el pollo pueden desarrollar cáncer por un agente infeccioso (Rous sarcoma virus) en 1911, descubierto por Peyron Rous, otro ejemplo son conejos en contacto con alquitrán de hulla en 1915 realizado por Yamagiwa e Ichakawa. Para este entonces, los niveles de cáncer seguían subiendo, hasta 1928,

cuando George Papanicolaou descubre que el cáncer cervical puede ser detectado examinando células de la vagina, permitiendo que sea detectado y removido antes de ser dañino, ayudando a reducir muertes por cáncer cervical hasta un 70 %. Combinando tratamientos en 1937 se usó cirugía y después radiación contra tumores por sir Geoffrey Keynes, en 1941 Charles Huggins descubre que, removiendo los testículos para bajar la producción de testosterona y administrar estrógenos causa un retroceso en tumores de próstata también llamado terapia hormonal. Se ha llegado a tal grado de probar sustancias que fueron pensadas para la guerra y no para tratar el cáncer, como derivados del Gas Mostaza, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en 1949 como un agente alquilante; no fue hasta 1950 cuando Ernst Wyder, Everts Graham y Richard Doll identificaron que fumar cigarrillos era un factor importante para desarrollar cáncer de pulmón. Posteriormente en 1960, Peter Nowell y David Hungerford describen un inusual cromosoma pequeño en pacientes con leucemia mieloide crónica llamado cromosoma filadelfia donde, básicamente, el cromosoma 22 y 9 se entrecruzan dando un fenotipo con leucemia. No fue hasta 1964 que el Epstein -Barr virus es ligado con cáncer humano linfoma de Burkitt, también puede causar cáncer nasofaríngeo. En 1977 mediante una prueba piloto se demostró que combinando Cisplatino, Vinblastina y Bleomicina, puede curar 70 % de pacientes con cáncer testicular avanzado; el año siguiente, la FDA aprueba el uso del Cisplatino, un complejo con platino, el cual es afín a los sitios ricos en guanina-cisteína, provocando entrecruzamientos con más ADN y proteínas, resultado en el bloqueo de la lectura del material genético, generando apoptosis. En 1978 la FDA aprueba Tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor a estrógenos primero en su clase usado en cáncer de mama. En 1979 el gen TP53 conocido también como p53, se identifica como el gen más mutado en cáncer humano, es un gen supresor de tumores productor de la proteína 53 que ayuda al control de la proliferación celular y supresión del crecimiento de tumores. En 1981 la FDA aprueba la primera vacuna contra Hepatitis B una de las primeras causas de cáncer de hígado. En 1984 se identifica material genético del virus del papiloma humano tipo 16 y 18 en cáncer cervical, actual factor infecciosos de cuidado. El cáncer de próstata, uno de los más

comunes en hombres, es diagnosticado con la prueba de antígeno específico de próstata en 1986 ayudando a su tratamiento precoz. Se aprobaron fármacos como la Epopoetin Alpha para estimular la producción de glóbulos rojos contra la anemia que se produce en las quimioterapias; uniéndose a otros fármacos como el filgrastin que es un estimulante de la producción de glóbulos blancos, reduciendo el uso de transfusiones sanguíneas en 1989. Haciendo un avance en la forma de remover el tumor, en 1990 se usa la cirugía laparoscópica que consiste en hacer muchas incisiones pequeñas usando un equipo telescópico para remover tumores, alternativa a cirugías tradicionales abiertas. En el mismo año se empezaron a usar terapias con radiación 3D. Un año después, en 1991, por primera vez el récord de casos de mortalidad debida a cáncer desde 1930 -que empezó- disminuye. Según el NCI (National Cancer Institute), CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y ACS (American Cancer Society) reportan disminución del índice de muerte de 2.6 % de 1991 a 1995 y de 18 % de 1991 a 2008, un pequeño gran avance. Después en 1994 el gen BRCA1 supresor de tumores fue clonado, mutaciones heredadas en este gen generalmente aumenta el riesgo de cáncer de mama y ovario. Y a partir de estas fechas las sustancias usadas contra el cáncer comenzaron a variar mucho: 1996 anastrozole inhibe la producción de estrógeno en el cuerpo en cáncer de mama, 1997 rituximab siendo un anticuerpo monoclonal contra linfoma de célula B se usa, 2010 se aprueba vacuna contra HPV (human papiloma virus) llamada Gardasil, 2010 sipuleucel-T, primera vacuna contra el cáncer que usa tus propias células del sistema inmune, 2013 Ado-trastuzumab Emtasine un anticuerpo conjugado usando en cáncer de mamá HER2+. Esto solo es una breve introducción sobre la terapéutica del cáncer, pero aseguro que actualmente hay muchísimos laboratorios de investigación evaluando actividades anticancerígenas de un sin fin de sustancias, tanto sintéticas como naturales. Tal es el caso de los flavonoides que hoy en día se evalúan ante todo tipo de líneas celulares.

GLOBOCAN [3] Fig. 1 el proyecto que da a conocer el desarrollo del cáncer a nivel mundial, la página Global Cancer Observatory nos da el puente entre diferentes

herramientas:



**Fig 1 GLOBOCAN. Fuente:** [3]

**Cancer Today:** Que provee herramientas para estimar la incidencia, prevalencia y mortalidad actuales de 36 tipos de cáncer en 185 países por sexo y edad.

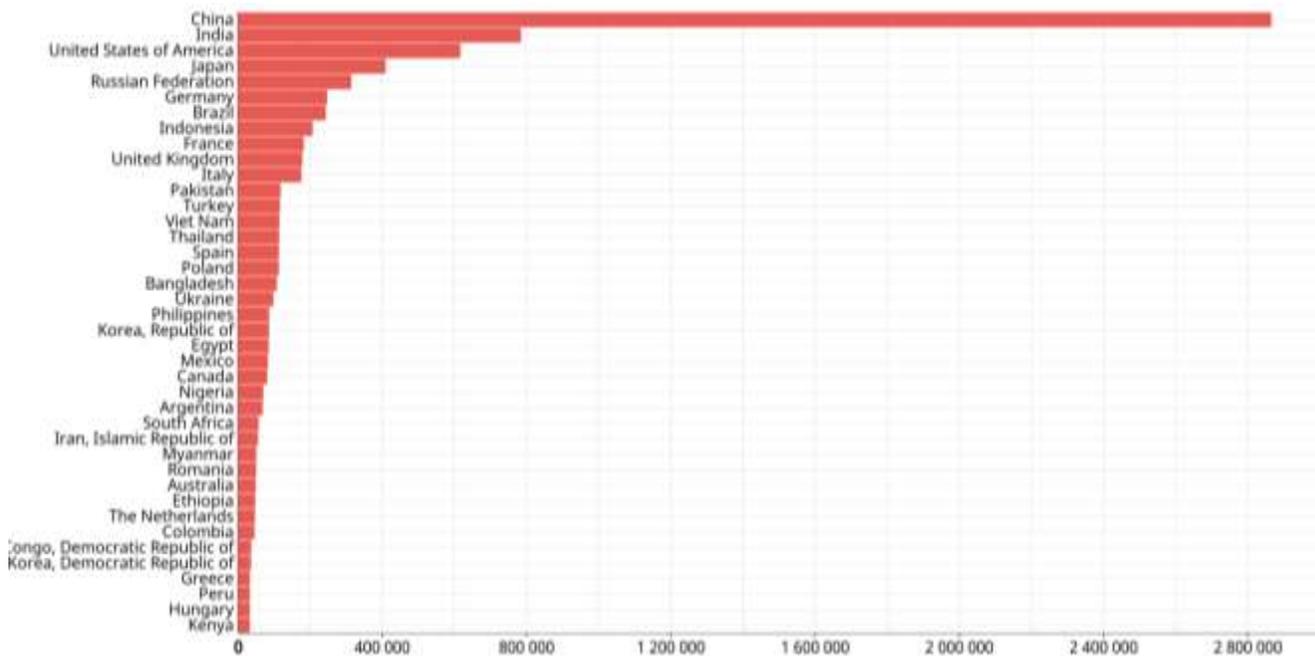
**Cancer Over Time:** Nos permite visualizar datos de la porción cambiante de incidencia y mortalidad de cáncer a lo largo de medio siglo, basado en información de alta calidad de 40 países.

**Cancer Tomorrow:** Predice la incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial a partir de los estimados actuales en 2018 hasta el 2040.

**Cancer Causes:** Herramienta para visualizar la conexión entre cáncer y sus posibles causas, cuantificando el grado en el que diferentes tipos de cáncer es atribuido a específicos estilos de vida y a factores de riesgo ambientales a nivel mundial.

## **1.2 Incidencia y Mortalidad**

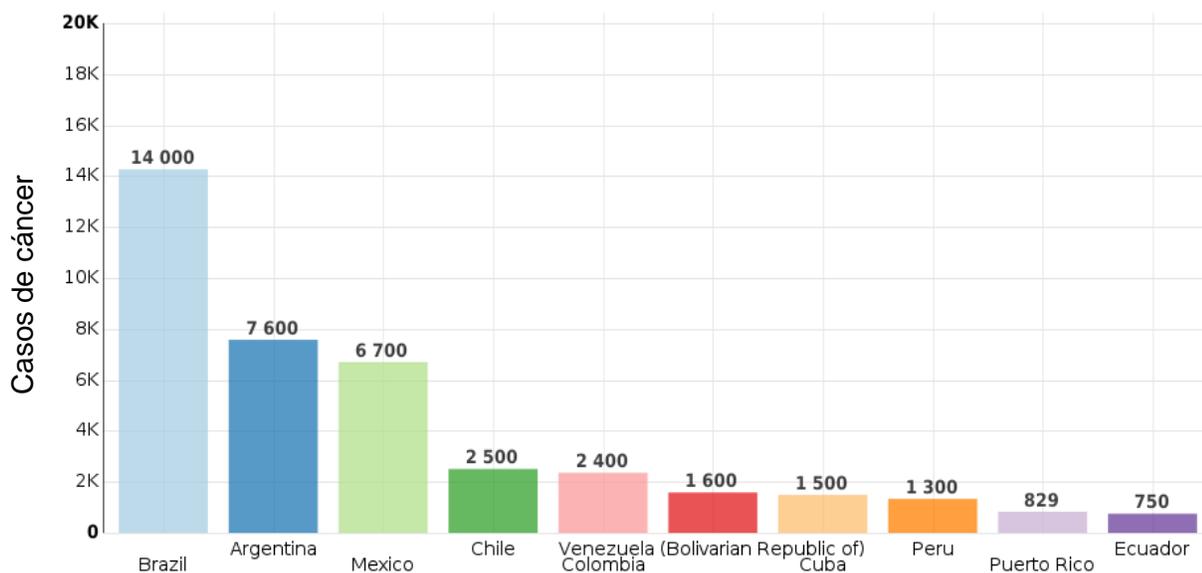
México cuenta con un estimado de 83 476 muertes por cáncer en ambos sexos por año en todas las edades según el CANCER TODAY. Ocupa el lugar 23 en muertes por cáncer a nivel mundial (Fig 2).



**Fig. 2 Muertes estimadas por cáncer a nivel mundial, ambos géneros, todas las edades, en todos los tipos de cáncer durante el 2018. CANCER TODAY Fuente: [3]**

El cáncer hipofaríngeo es un tipo del cáncer de cavidad de laringe y faringe, el cual ocupa un lugar significativo en relación con los demás en cuanto a su incidencia, en un análisis obtenido GLOBOCAN 2008, señala que el cáncer de labios y cavidad oral es el octavo más común en los hombres [4]; se diagnostican aproximadamente 600,000 casos en el mundo [5, 6] . El consumo de tabaco ha sido identificado como el factor de mayor riesgo [4]. De hecho, casi el 65% del cáncer oral es atribuido el consumo del tabaco [5].

Sin embargo, estudios epidemiológicos han documentado un efecto sinérgico entre el consumo de tabaco y beber alcohol [7] y el riesgo atribuible a estos dos factores se estima en un 74% [8]. Algunas otras investigaciones señalan que existe relación entre el cáncer oral con otros hábitos inseguros como el consumo de mate [9] y la enfermedad periodontal [10]. La tasa de supervivencia del cáncer hipofaríngeo varía de acuerdo al estadio, la supervivencia de 5 años para cáncer hipofaríngeo es del 33%. Cuando se detecta en estadio temprano y localizado, la tasa de supervivencia es del 53%. Cuando este cáncer se ha diseminado a la zona de los ganglios linfáticos cercanos, la tasa de supervivencia es de cinco años y el porcentaje de supervivencia oscila entre el 36% y 39%. Si el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo, la tasa de supervivencia a 5 años es del 24% y aproximadamente el 54% de los casos se diagnostican en este estadio. La realidad de México es que ocupa el tercer lugar en incidencia en América Latina (Fig. 3) y el

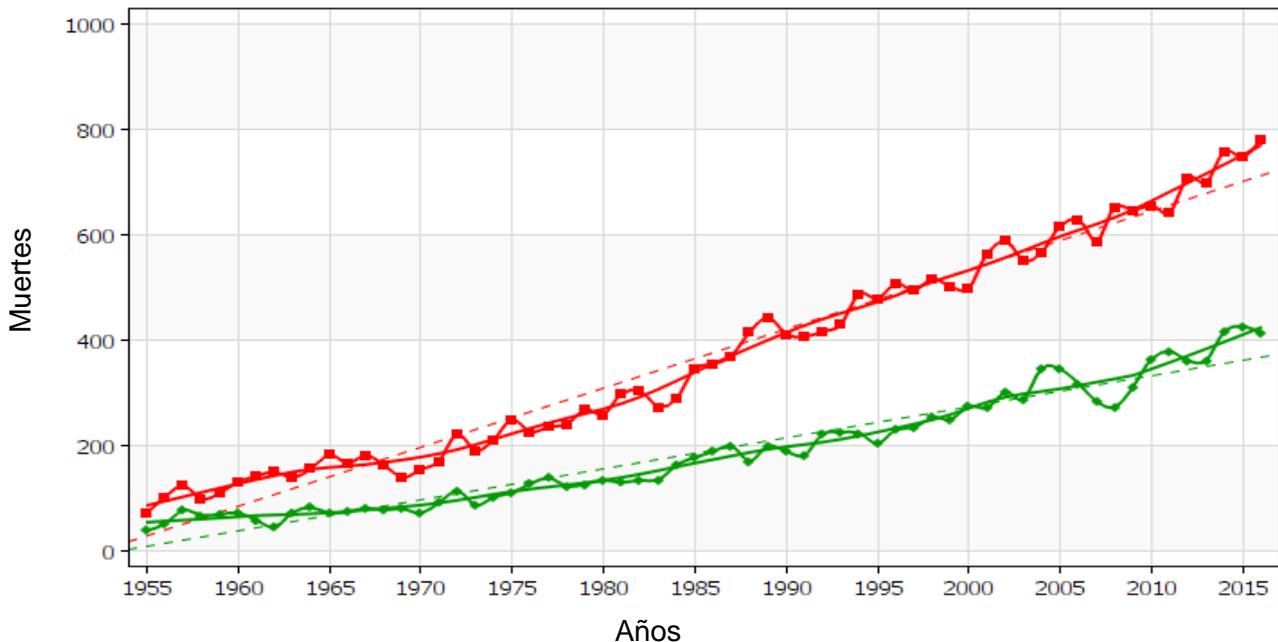


cáncer de labios, cavidad oral, faringe y

**Fig 3 Casos de cáncer en América Latina en ambos géneros en el 2012.**

**Fuente:** [3]

orofaríngeo sigue aumentando en hombres y mujeres mexicanos según se observa en GLOBOCAN Cancer over the time (Fig. 4).



**Fig 4** Récord de muertes en México por cáncer en la cavidad oral y faringe, todas las edades en rojo hombre en verde mujeres. Fuente: [11]

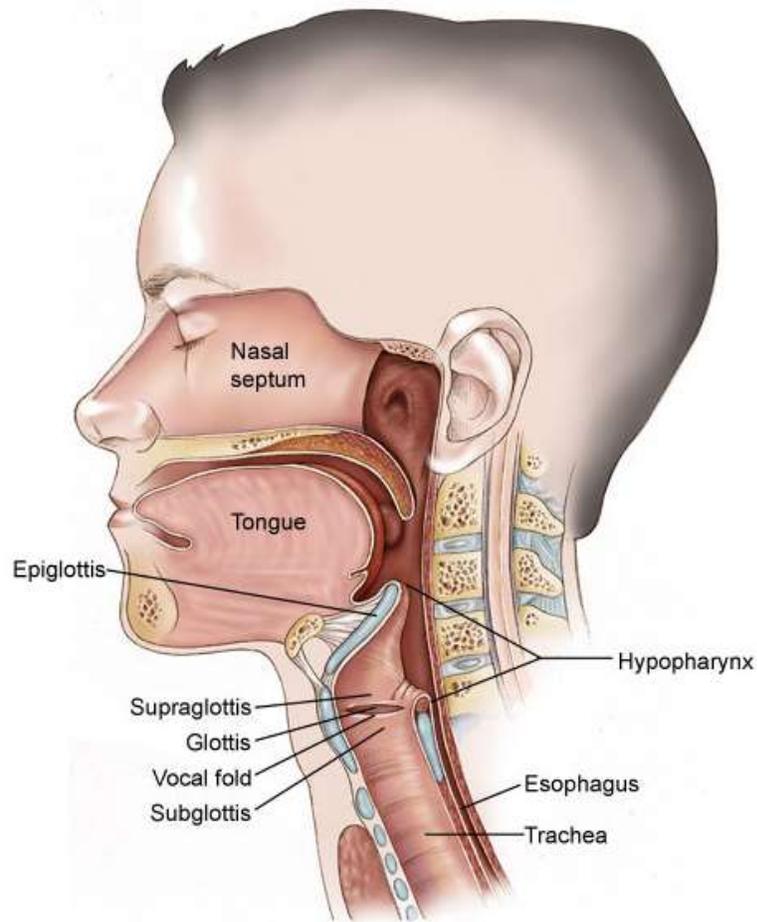
### 1.3 Características clínicas del cáncer de hipofaringe

El carcinoma de cabeza y cuello tiene aproximadamente 600,000 casos nuevos cada año[12, 13]. El carcinoma de cabeza y cuello consiste en la principal manifestación del cáncer y radica en un grupo tumores que se originan en el epitelio escamoso de la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe. Como se muestra en la Fig. 5 la hipofaringe se ubica en la entrada al esófago, compartiendo tejidos con la caja vocal, parte de la laringe que origina la voz.

Se ha encontrado que, en los pacientes de carcinoma de células escamosas, se ven involucrados de igual manera los nodos linfáticos.

Cualquier persona en cualquier edad, en cualquier estadio del cáncer, debe recibir cuidados paliativos enfocado en reducir los síntomas, aumentado la calidad de vida del paciente y apoyando a su familia. Cabe mencionar que, en caso de metástasis todas las terapias pueden ser usadas en el plan terapéutico. Así mismo, una vez tratado el cáncer existe la posibilidad de remisión o volver a presentar cáncer. Las personas que dejan de usar tabaco y alcohol antes del tratamiento aumentan las posibilidades de un tratamiento exitoso. Recuperarse del cáncer no siempre es posible. Cuando el cáncer no puede ser tratado o controlado se le llama avanzado

o terminal, las personas en este estado pueden recibir un tratamiento paliativo, cuidado



**Fig. 5 Cavidades. Fuente:** [14]

de hospicio diseñado para brindar la mejor calidad de vida posible a las personas cuya vida se acerca al final.

#### **1.4 Factores de riesgo del cáncer hipofaríngeo.**

Se considera un factor de riesgo a todo aquello que aumenta la probabilidad de que una persona desarrolle el padecimiento. A pesar de que los factores de riesgo influyen en el desarrollo del cáncer, la mayoría de estos factores no provoca cáncer de manera directa, debido a que en ocasiones personas que presentan varios factores de riesgo no desarrollan cáncer y personas sin factores de riesgo si lo

hacen [8]. La siguiente información se obtuvo de las páginas de la Sociedad Americana de Cáncer y Oncología [15].

Tabaco: El consumo de tabaco, incluidos cigarrillos, cigarros, pipas, tabaco de mascar, marihuana y rapé es el factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de cabeza y cuello. El 85 % de los casos de cáncer de cabeza y cuello están ligados al consumo de tabaco. Asimismo, los fumadores pasivos también tienen un mayor riesgo.

Alcohol: El consumo frecuente y abundante de alcohol aumenta el riesgo de cáncer laríngeo e hipofaríngeo. El consumo combinado de alcohol y tabaco aumenta aún más este riesgo.

Otros factores que pueden aumentar el riesgo de que una persona desarrolle cáncer laríngeo e hipofaríngeo incluyen:

Sexo: Los hombres son de 4 a 5 veces más propensos a desarrollar cáncer laríngeo e hipofaríngeo que las mujeres.

Edad: Las personas de más de 55 años tienen un mayor riesgo, aunque las personas más jóvenes también pueden desarrollar estos tipos de cáncer.

Raza: En E.U.A. Las personas de raza negras y blancas tienen más probabilidades de desarrollar cáncer laríngeo e hipofaríngeo en comparación con la población de origen asiático e hispano.

Inhalantes ocupacionales: La exposición al asbesto, el aserrín, los vapores de pintura y ciertos productos químicos pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer laríngeo e hipofaríngeo.

Nutrición deficiente: Una dieta baja en vitaminas A y E puede elevar el riesgo que tiene una persona de desarrollar cáncer laríngeo e hipofaríngeo. Los alimentos ricos en estas vitaminas pueden ayudar a prevenir la enfermedad, incluidas las frutas y verduras frescas.

Síndrome de Plummer-Vinson: Esta afección poco frecuente se relaciona con la deficiencia de hierro y provoca dificultad para tragar. La presencia de esta enfermedad aumenta el riesgo de cáncer hipofaríngeo.

Higiene bucal deficiente: No cepillarse los dientes con regularidad o no usar hilo dental puede aumentar el riesgo de cáncer de cabeza y cuello. Se recomienda

realizar chequeos dentales dos veces al año para todas las personas que corren el riesgo de estos tipos de cáncer, aunque dos veces al año debería ser mínimo para una persona saludable.

Enfermedad del reflujo gastroesofágico: El reflujo crónico de ácido estomacal en la laringe y la faringe se puede asociar con el cáncer laríngeo e hipofaríngeo. Sin embargo, no se ha demostrado ninguna relación causal específica. Esto se puede asociar o no con síntomas de acidez estomacal.

### **1.5 Signos y Síntomas**

Las primeras valoraciones para averiguar si el paciente tiene cáncer son: inflamación o una herida que no sana es el síntoma más común, un cúmulo rojo o blanco en el interior de la boca, una protuberancia en la cabeza o cuello con o sin dolor, dolor de garganta persistente, olor fétido en boca independientemente del aseo, ronquera o cambio del tono de voz, obstrucción nasal o congestión nasal persistente, sangrado nasal frecuente o descarga de moco inusual, dificultad para respirar, visión doble, adormecimiento o debilidad de la parte de la cabeza o cuello, dificultad o dolor al masticar, deglutir o al mover la lengua o la quijada, pérdida de dientes, fatiga y dolor o infección de oído. Ya que los síntomas se identificaron el médico debe mandar a hacer alguna o varias de las siguientes pruebas diagnósticas [16].

### **1.6 Diagnóstico**

Los siguientes estudios pueden realizarse uno o un conjunto de ellos para diagnosticar cáncer de cabeza o cuello: examen de orina, examen físico de la sangre (biometría hemática), endoscopía, biopsia, prueba molecular del tumor, rayos X mientras se deglute una solución de Bario, radiografía panorámica, ultrasonido, tomografía computarizada, imagenología por resonancia magnética, escaneo de huesos, tomografía de emisión de positrón.

El diagnóstico del cáncer debe comprender dos grandes grupos entre los que se encuentran los pacientes infectados por Papilomavirus y pacientes que consumen tabaco y alcohol. Los pacientes que desarrollan este carcinoma se infectan con

frecuencia con el subtipo HPV-16 (Human Papiloma Virus) y en particular, jóvenes infectados con HPV desarrollan este carcinoma dentro del tejido linfoide asociado del epitelio de la amígdala o base de la lengua aun siendo no fumadores [17] .

### **1.7 Terapéutica contra el cáncer**

Los tratamientos involucran: terapia con radiación, terapia dirigida a un tipo de tumor en específico, inmunoterapia, quimioprevención, terapia fotodinámica y cuidados paliativos. Cuando un grupo de médicos planean un tratamiento, tienen que considerar cómo el plan terapéutico afecta la calidad de vida del paciente incluyendo cómo la persona siente, su apariencia, la forma de hablar, comer y respirar. El cáncer de laringe e hipofaringe y sus tratamientos pueden impactar en estas funciones

significativamente. De los tratamientos previamente mencionados tres son los principales: terapia con radiación, cirugía y quimioterapia. Uno o la combinación de estas terapias son usadas para el tratamiento del cáncer. Cirugía y radiación son las más comunes. Existen algunos inconvenientes en las terapias. Antes del uso de radiación las piezas dentales dañadas deben de ser removidas debido a que serán afectadas. La radiación puede causar inflamación y heridas, la voz y la deglución se ven afectadas, el tipo de radiación más usada es llamada terapia de radiación con rayos externos, aunque también se usan implantes de brachiterapia. La quimioterapia implica vía intravenosa de un fármaco o una mezcla, al mismo tiempo siguiendo un régimen de ciclos en un periodo de tiempo. Sus efectos adversos incluyen fatiga, vómito, caída del cabello, náusea, pérdida de apetito, diarrea, boca seca y pérdida de la capacidad auditiva. Existen varios procedimientos: laringectomía parcial de supraglotis, cuerdas vocales, hemilaringectomía vertical, laringectomía total, laringofaringectomía, disección de nódulos linfáticos cercanos al cuello, cirugía láser y traqueostomía. Todos estos procedimientos implican una reconstrucción después de la cirugía [18].

## **1.8 Prevención**

Diferentes tipos de factores producen diferentes tipos de cáncer. Los investigadores continúan estudiando los factores que provocan estos tipos de cáncer. Si bien no existe una forma comprobada de prevenir por completo esta enfermedad, tal vez pueda reducir el riesgo. Interrumpir el consumo de productos derivados del tabaco es lo más importante que una persona puede hacer, incluso las que fuman desde hace muchos años [15]. Evitar la exposición al humo también es importante. Además, beber alcohol aumenta el riesgo. Incluso las personas que beben pequeñas cantidades (1 bebida por día) tienen un riesgo mayor de desarrollar cáncer.

## **1.9 Genética y epigenética del carcinoma de células escamosas**

A pesar de la naturaleza inmunosuprimida del cáncer oral diversos investigadores se han abocado en la búsqueda de marcadores biológicos con el fin de establecer un diagnóstico temprano y evitar la elevada morbilidad de esta enfermedad. El escenario no es sencillo debido a que se ha encontrado un amplio espectro de cambios cromosomales, mutaciones en la copia del ADN, mutaciones somáticas y metilaciones de los promotores.

Se sabe que el cáncer de células escamosas (CCE) tiene mayor cambio en genes en pacientes no infectados por HPV que los que sí fueron infectados por este virus. Dentro de los cambios cromosomales detectados se registran pérdidas, ganancias, co-amplificaciones y deleciones de material genético [19].

En estudios realizados de secuencia de genoma completo se encontraron mutaciones somáticas en los genes TP53 (Proteína -de Tumor -p53), CDKN2A (inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa 2A), PTEN (Homologo a la fosfatasa y la tensina) , PI3KCA (subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa) y HRAS (HRas proto-oncogen, GTPase) [20, 21] y mutaciones en las proteínas involucradas en la vía de señalización de NOTCH, observando que tumores de HPV-negativos presentan más mutaciones que tumores HPV-positivos. Por otra parte, las mutaciones se han identificado con más frecuencia en tumores

de fumadores comparado con los no fumadores en ambos HPV-positivo y HPV-negativo.

Las mutaciones somáticas que se han identificado con más frecuencia son las que están involucradas con genes los supresores de tumores como TP53 y CDKN2A. Las mutaciones de TP53, involucran al gene p53 muy presente en HPV-negativos, lo que ocasiona la inactivación o pérdida de función. Mutaciones en TP53 son mutaciones disruptivas que han estado asociadas con una baja prognosis y resistencia a la terapia [22]. Por otra parte, el gen CDKN2A codifica para la proteína p16 que regula el progreso del ciclo celular bloqueando la actividad de CCND1 (gene que codifica para la ciclina D1) y de las cinasas dependientes de ciclina (CDK4 y CDK6) que fosforilan e inactivan al supresor de tumores RB1. CDKN2A puede irrupirse por mutaciones somáticas, delección o hipermetilación del promotor [23]. La sobreexpresión de ciclina D1 y amplificación de CCND1 están asociados con una pobre prognosis y resistencia a terapias, aún en las que se incluyen inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).

Se han detectado alteraciones genómicas en diversas vías señalización entre las que incluyen fosfatidilinositolfosfato 3-cinasa (PI3K), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR) y RAS [24-27]. Frecuentemente está mutado y amplificado el gene PIK3CA, que codifica para la subunidad p110- $\alpha$  la enzima PI3K se presenta en un 37% en CCE y más en tumores HPV-positivos. Otros de los componentes que está comúnmente alterado es PTEN con mutaciones o pérdida de copias del gene. Cuando el receptor al factor de crecimiento epidermal se expresa en altos niveles, está asociado a una baja prognosis [28].

En contraste con genética, los estudios de epigenética sugieren las modificaciones del genoma más frecuentes son metilaciones aberrantes y las modificaciones menos estudiadas son la modificación de histonas y la expresión alterada de miRNAs. En la Tabla 1 se presentan los genes con más metilaciones aberrantes detectadas y con las cuales se podría identificar biomarcadores del avance del cáncer en células escamosas de cáncer oral (OSCC) [29].

Tabla 1 Genes con aberración epigenética de metilación en cáncer oral		
Gen	Función y consecuencia de la modificación	Referencia
APC (adenomatous polyposis coli)	Gen supresor de tumores activa indirectamente WNT, ↑ β-catenina, ↑división celular	[30, 31]
Survivin/BIRC5 (baculo viral inhibidor de apoptosis contiene a la proteína 5)	Generalmente metilado, en OSCC hipometilación que causa más letalidad en el cáncer	[32-34]
E-cadherina (CDH cadenina 1)	Proteína de adhesión, al hipermetilarse en gen o región promotora se reduce su expresión y aumenta la invasión	[30, 35-37]
MGMT (metil transferasa)	Gen reparador de aductos de guanina, hipermetilación de su región promotora inhibe expresión	[38-40]
MLH1 (mutL Homologo 1)	Gen reparador de material genético mal empalado, hipermetilación de su región promotora inhibe expresión	[41-43]
p 14 <sup>ARF</sup>	Gen supresor de tumores, hipermetilación resulta en pérdida de función de p53, induciendo proliferación	[44, 45]
p 15 <sup>INK4A</sup>	Gen supresor de tumores, inhibe ciclo celular, hipermetilación promueve división celular	[45, 46]
p 16 <sup>INK4A</sup>	Gen supresor de tumores, inhibe ciclo celular, hipermetilación promueve división celular	[47-49]
RARβ	Miembro de receptores asociados con factores nucleares, ligan hormonas	[50, 51]

(receptor $\beta$ de ácido retonico)	tiroideas, hipermetilación aberrante promueve OSCC	
RASSF (familia 2 de dominios asociados a RAS)	Gen supresor de tumores y regulador de ciclo celular, apoptosis y formación de microtúbulos, hipermetilación inhibe funciones	[25, 39, 43, 52]

### 1.10 Sistema inmune y cáncer

Muchos estudios han identificado que existe disfunción de células del sistema inmune con el microambiente de los tumores, lo que provoca la evasión de la respuesta inmune, reconocimiento y eliminación. De igual manera, se presentan diversas alteraciones que pueden ser cualitativas o cuantitativas tanto en la población de células inmunes, como en la regulación de los puntos de control inmune, o bien, por defectos en la presentación de antígenos, que junto con los factores microambientales como la secreción de citocinas que altera el equilibrio en la matriz extra celular, creando un efecto enmascarante por la inmunosupresión permitiendo la evasión de tumor de la vigilancia inmunológica. Las células tumorales con frecuencia tienen reducida expresión del antígeno de leucocitario humano clase I (HLA) y en la maquinaria de presentación de antígenos [53]. En los tumores se presenta un amplio espectro de respuestas desde la ausencia de células inmunes hasta la presencia de células inmunes, pero con funciones desacopladas como las células asesinas (NKC). Pueden estar acompañados por la presencia de células inmunosupresoras entre la que se incluyen las células T, macrófagos, células supresoras derivadas mieloide. Citocinas inmunosupresoras producidas por células tumorales y poblaciones de células inmunosupresoras como VEGF, TGF, IL-6, IL-10, GM-CSF ejercen efectos inmunosupresores locales y sistémicos. Además, factores microambientales incluyendo hipoxia, vascularidad anormal, vascularidad linfática afectada y una alta presión intersticial puede influir en la liberación de citocinas, tráfico y función de células inmunes. [54].

La presencia de infiltrados de linfocitos está generalmente asociada con mejoría en la prognosis, las diferencias han sido reportadas de acuerdo a subsitios anatómicos

entre el compartimiento de cabeza y cuello y significativamente en HPV-positivos comparados con HPV-negativos.

El cáncer de células escamosas que surge del epitelio escamoso, se disemina fácilmente al tejido linfático de las amígdalas y en la base de lengua y tiende a tener un alto número de células inmunes infiltradas en el tumor y estroma comparado con otros subsitios [55].

### **1.11 Clasificación celular del cáncer de hipofaringe.**

Casi todos los tipos de cáncer de hipofaringe son de origen epitelial, predominantemente carcinomas de células escamosas (CCE, es decir, epidermoide), y pueden estar precedidos de varias lesiones precancerosas [56, 57]. Entre los tipos de carcinomas de hipofaringe que son poco comunes se incluyen los siguientes:

Carcinomas basaloides de células escamosas.

Carcinomas de células fusiformes (es decir, sarcomatoides).

Carcinomas microcíticos.

Carcinomas no diferenciados de tipo nasofaríngeo (es decir, linfoepiteliomas).

Carcinoma de las glándulas salivales menores.

Los tumores no epiteliales como los linfomas, los sarcomas y los melanomas, exigen consideración especial y, por lo tanto, no se incluyen en el presente trabajo. [58-60]

Por lo general, los CCE invasivos tienen una diferenciación moderada o precaria y, de forma invariable, presentan una tinción positiva para la queratina. Con frecuencia, se observa carcinoma *in situ* adyacente al CCE invasivo. [61]

### **1.12 Clasificación clínica**

En un ámbito más hospitalario los médicos se ayudan del sistema TNM [62] para diagnosticar al paciente, respondiendo las siguientes preguntas: ¿Qué tan grande es el **Tumor** y dónde se localiza?, si el tumor se ha esparcido a **Nódulos** linfáticos, ¿dónde? y ¿qué tanto?, y si el cáncer presenta **Metástasis** ¿qué tanto? Resolviendo estas preguntas se puede asignar un estadio o etapa al cáncer.

En el sistema **TNM**, cada letra recibe un término y clasificación de acuerdo a sus características. Por parte de los nódulos linfáticos, que son tejidos blandos en forma de frijol que ayudan a pelear contra el cáncer, cuando el cáncer se ha diseminado a un nódulo linfático y en tejido aledaño es llamado extensión extranodal (ENE), esta característica es importante en la evaluación de los nódulos linfáticos en cáncer hipofaríngeo. La M en el sistema TNM indica si el cáncer se ha esparcido a otra parte del cuerpo distante llamado metástasis.

Los doctores asignan un valor en el cáncer hipofaríngeo combinando las clasificaciones T, N y M y establecen qué tipo de estadio tiene el cáncer del paciente. El cáncer puede ser recurrente, en otras palabras, después de un tratamiento para cáncer, este regresa, se necesita volver a evaluarlo.

Los doctores describen los tipos de cáncer por grados, mencionando qué tanto es que las células cancerígenas se parecen a células sanas debajo del microscopio. El doctor compara un tejido sano con un tejido cancerígeno. El tejido sano comúnmente contiene diferentes tipos de células agrupadas. El grado del cáncer puede predecir que tan rápido el cáncer se esparcirá. En la tabla 2 se esquematiza las posibles combinaciones del sistema TNM.

**Tabla 2 Sistema TNM para clasificación clínica de cáncer**

	X	is / 0	1	2	3	4
T (tumor)	No evaluable	Carcinoma en una sola capa de tejido	Tumor de 2 cm	Tumor de 2 a 4 cm	Tumor mayor a 4 cm	Tumor esparcido en zonas aledañas
N (nódulos)	No evaluable	No hay cáncer en nódulos	Nódulo linfático afectado con tumor de 3 cm	Nódulo linfático afectado con tumor de 3 a 6 cm	Nódulo linfático afectado con tumor mayor de 6 cm y ENE	-

<b>M</b> (metasis)	No se ha esparcido	-	El cáncer se ha esparcido	-	-	-
<b>Estadio</b>	Tis N0 M0	Tis N0 M0	T1 N0 M0	T1-3 N0-2 M0	T1-3 N0-3 M0-1	T1-4 N0-3 M0-1
<b>Grado</b>	No evaluable	-	Células con aspecto sano	Células con diferenciación moderada	Células que muestran poca diferenciación	Células con aspecto no sano

### 1.13 Proteínas celulares y su relación con el cáncer

Muchas proteínas celulares están reguladas por la adición o remoción de grupos fosfatos en un evento denominado ciclo de fosforilación/ defosforilación y a la fecha los mecanismos de catálisis de las enzimas involucradas en este proceso, han sido ampliamente estudiados, por su papel clave en la activación de vías de señalización. En estudios realizados en diferentes tumores mostraron evidencias de que estas enzimas se encuentran mutadas, lo que afecta el funcionamiento adecuado de las cascadas de transducción de señales, lo que conduce a un crecimiento celular descontrolado y comportamiento maligno [63, 64]. Por tanto, el descubrimiento de inhibidores que regulen el funcionamiento de las enzimas cinasas que son las responsables de la fosforilación en las células y en particular, en células tumorales, se ha convertido en el principal foco de investigación de un gran número de compañías farmacéuticas y de laboratorios de investigación básica.

### 1.14 Proteínas cinasa

Las proteínas cinasas representan un amplio grupo de enzimas relacionadas estructural y evolutivamente conservadas, que catalizan la fosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina de diversos sustratos. Estos aminoácidos hidroxifenólicos se encuentran ubicados en una secuencia consenso de reconocimiento de aminoácidos típicos en las proteínas cinasas. Con un grupo de

518 miembros de kinoma que es la suma de todos los genes que codifican para cinasas constituyen el 2% del genoma humano [65]. Estas proteínas se descubrieron en 1959, con el aislamiento de la primera cinasa serina/treonina del músculo y veinte años después se caracterizó la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Las cinasas muestran un amplio espectro de características con una gran diversidad en tamaño, especificidad por sustrato, mecanismo de activación, regulación, composición por subunidades, localización subcelular y todas comparten una región catalítica altamente conservada. El kinoma las organiza de la siguiente manera [65]:

- I. TK (tirosina cinasas)
- II. TKL (parecidas a tirosina cinasas)
- III. STE (STE20, STE11, y STE7)
- IV. CK1 (caseína cinasa 1)
- V. AGC (relacionadas a proteína cinasa A, proteína cinasa G y proteína cinasa C)
- VI. CAMK (Ca<sup>2+</sup>/cinasas dependientes de calmodulina)
- VII. CMGC (relacionadas con Cdk, MAPK, GSK, y parecidas a la Cdk)
- VIII. RGC (receptor guanilil ciclasa)

Por otra parte, las fosfatasas son enzimas que revierten el estado de fosforilación de las proteínas. A la fecha se han caracterizado aproximadamente 226 [66]. El proceso de fosforilación/defosforilación es complejo y una fosfatasa puede de manera simultánea actuar sobre múltiples sustratos y varias vías de señalización. El concepto de fosforilación de proteínas de manera reversible fue desarrollado por investigadores de la Universidad de Washington, E. Fischer y E.G. Krebs, con la elucidación del control hormonal de la glucogenólisis [67], con estos hallazgos obtuvieron el Premio Nobel en Medicina en 1992.

Algunos de los sustratos de las proteínas cinasas han sido ampliamente caracterizados como la proteína supresora de tumores p53, que es blanco de más de 30 diferentes proteínas cinasas y se fosforila en más de 20 sitios. La serina en posición 15 es fosforilada por más de ocho diferentes proteínas cinasa [68, 69]. La caracterización del blanco específico de las proteínas cinasas ha sido resultado del trabajo de un gran número de laboratorios de investigación en el mundo, un aspecto

de gran impacto es que los cambios en el estado de fosforilación de una proteína afectan su función de manera instantánea sin que la proteína presente alteraciones de tipo genético, por este motivo el equilibrio fosforilación/desfosforilación es de gran importancia en la homeostasis celular.

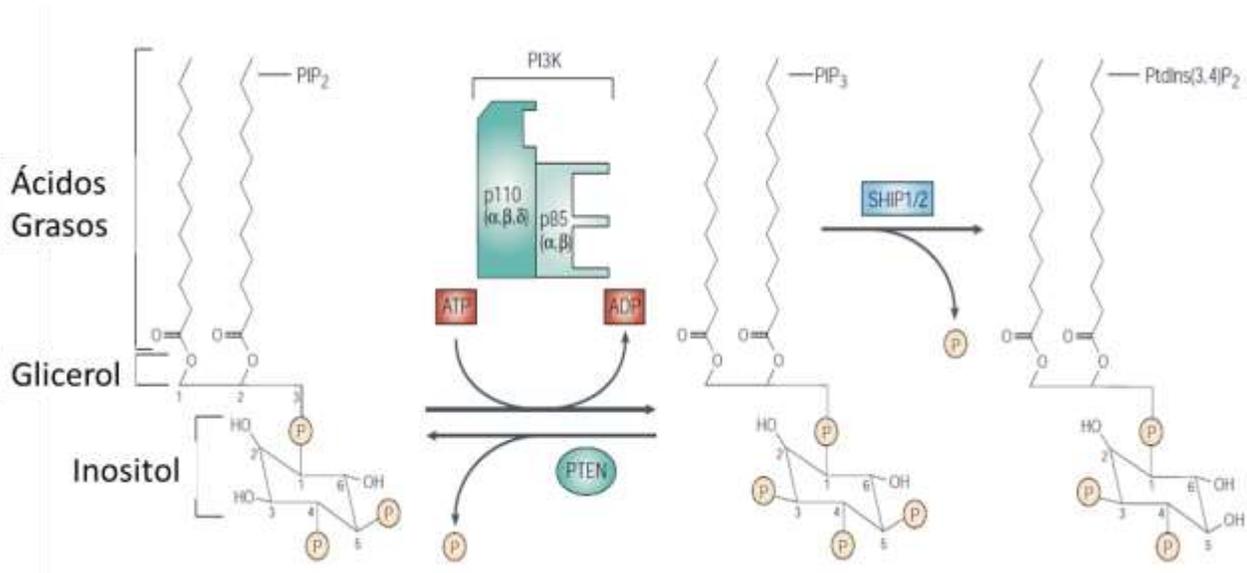
### **1.15 Blancos contra el cáncer**

En el 2017 se publicó que un total de 150 fármacos han sido aprobados por la FDA (Food and drugs administration), donde 61 de estos fármacos son de efecto citotóxico y 89 de ellos tienen un blanco específico en las células, de estos últimos los blancos más destacados son las- tirosina cinasas seguidas de receptores transmembranales, receptores nucleares dependientes de un ligando y las serina/treonina cinasas [70]. Las serina/treonina cinasas ocupan un blanco peculiar de acción puesto que muchas de ellas ejercen un efecto proliferativo en las células, las vías de señalización están en función de estas serina/treonina cinasas. Las vías de señalización de mayor estudio son: AKT/PI3K , Wnt, y los marcadores de la transición epitelial a mesenquimal (EMT). La primera vía de señalización se ilustra en esta sección pues es el blanco de estudio de esta investigación.

### **1.16 Señalización intracelular de la proliferación**

Se sabe que el crecimiento, proliferación y supervivencia celular está mediado por factores de crecimiento, los cuales, al ser encontrados por su receptor en la superficie externa de la célula, promueve una respuesta intracelular que dependientemente del ligando promoverá el crecimiento y la proliferación. Una vez que el factor de crecimiento se ha unido a su receptor que puede ser un receptor

tirosina cinasa (RTK) o un receptor acoplado a proteínas G, se transduce como un estímulo interno permitiendo que PI3K haga su función Fig. 6 [71].

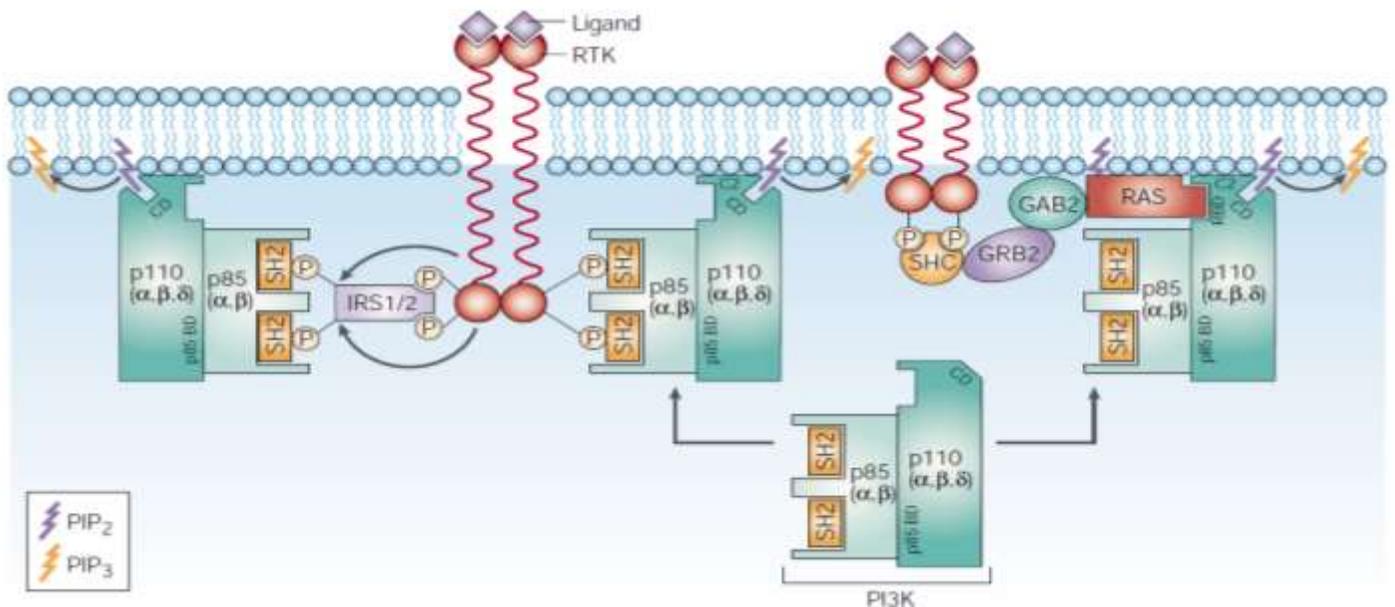


**Fig. 6 Función de PI3K. PI3K una vez activada se encarga de fosforilar el grupo inositol en la posición 3 obteniendo fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato. Fuente: [72].**

### 1.17 Vía de señalización PI3K/Akt.

PI3K es una enzima con actividad de cinasa, que añade un grupo fosfato al inositol, el producto de PI3K es el fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) como se observa en la figura 6. Se han identificado 3 clases de PI3K [72]. Todas las clases comparten el dominio catalítico p110, el dominio C2 de unión a la membrana interna y un dominio de unión entre estos dos. La clase I se divide en 2 grupos IA y IB. El primer grupo IA usa como sustrato fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) y también tiene asociado con un dominio SH2 y una subunidad reguladora p85 alfa, p85 beta, p55 gama y p55 alfa. La clase IB es un complejo con una subunidad reguladora p101 o p87 con un dominio SH2 con diferente distribución tisular. Cabe señalar que los dominios SH2 son afines a receptores fosforilados (RTKs). Como se puede observar en la figura 7 PI3K puede asociarse con proteínas chaperonas de la familia RAS, pero no es la única, varias proteínas se unen a RAS en un manera dependiente de GTP, se ha demostrado la activación de PI3K independiente de RTKs. Hay más de una forma en que PI3K puede ser reclutada a la membrana celular por medio del

sustrato del receptor de insulina (IRS), las proteínas de la familia RAS , mediante la activación de receptores asociados a proteínas G en específico la clase IB y también independientemente de otras proteínas se puede asociar a los RTK (Fig. 7), en específico la clase IA, cuando el receptor RTK se une a su ligando se fosforila la cola citoplasmática y enseguida se recluta p85-p110 al receptor mediante del dominio SH2. PI3K se vuelve activa por dos razones: la subunidad p110 está cerca de su sustrato lipídico en la membrana y la interacción RTK-p85 produce un cambio estructural dejando al dominio catalítico sin la inhibición del dominio regulador. Por otra parte, PI3K de clase II carece de unidad regulatoria, pero tiene como sustrato fosfatidil inositol fosfato (PIP) por lo general en posición 4. La clase III tiene la actividad ortóloga con las levaduras Vps34p, la cual es fosforilar fosfatidil inositol como sustrato.



**Fig. 7 Activación de PI3K. PI3K puede ser activada mediante la interacción con sustratos del receptor de insulina (IRS), proteínas acopladoras (RAS GRB y GAB) o por unión directamente con el receptor (RTK). Fuente: [72].**

### 1.18 PTEN al rescate.

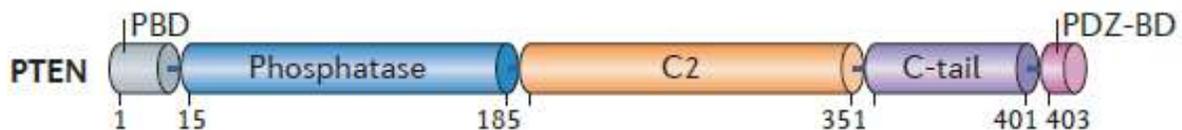
Desde la década de los 80s se observaba que pérdidas completas o parciales del cromosoma 10 provocaban cáncer de cerebro, vejiga y próstata. Hasta que en 1997

se identificó un gen supresor de tumores en el locus 10q23. Ese mismo año se identificó el homólogo de la fosfatasa y la tensina por sus siglas en inglés PTEN (phosphatase and tensin homologue). Enseguida generaciones de ratones knockout confirmaron que PTEN es un supresor de tumores en múltiples tejidos; a su vez revelando que la función de PTEN es de herencia haploinsuficiente, es decir si muta alguno de los alelos de PTEN, la expresión de y actividad de PTEN no es suficiente para lograr su función fisiológica. [28]

Se ha demostrado en ratones knock out que en el fenotipo cancerígeno se observa; en presencia de la mutación en PTEN y no en SHIP. Otra fosfatasa de menor importancia llamada SHIP por sus siglas es la fosfatasa con dominio SH2 que actúa en la posición 5' del inositol.

Se sabe que la principal función de PTEN es defosforilar el fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) con afinidad específica por el fosfato del anillo inositol en la posición D3. El PIP3 es un potente activador de la cinasa dependiente de 3 fosfoinositol (PDK) y de PKB o AKT. Esta última estimula el crecimiento y supervivencia celular. [73]

Los sustratos de la fosfatasa PTEN (Fig. 8) pueden ser dos: polipéptidos y fosfoinositol. PTEN consiste en 403 aminoácidos con 5 dominios diferentes: PBD dominio de unión a PIP2 (C1-15), Dominio catalítico de fosfatasa (16-185), dominio C2 le da estructura a la proteína permitiendo que la proteína sea reclutada a las membranas, con 8 betas plegadas en coordinación con iones  $Ca^{+2}$ , forman cavidades afines a la superficie de la membrana (186-351), cola C terminal unida a un dominio PDZ (postsynaptic density protein, disc large, zone occludens-1) para interacción con otras proteínas, reclutándolas en la membrana celular internamente.



**Fig. 8 PTEN. Estructura de PTEN. Fuente: [28].**

### 1.19 Cascada abajo de PIP<sub>3</sub>: AKT

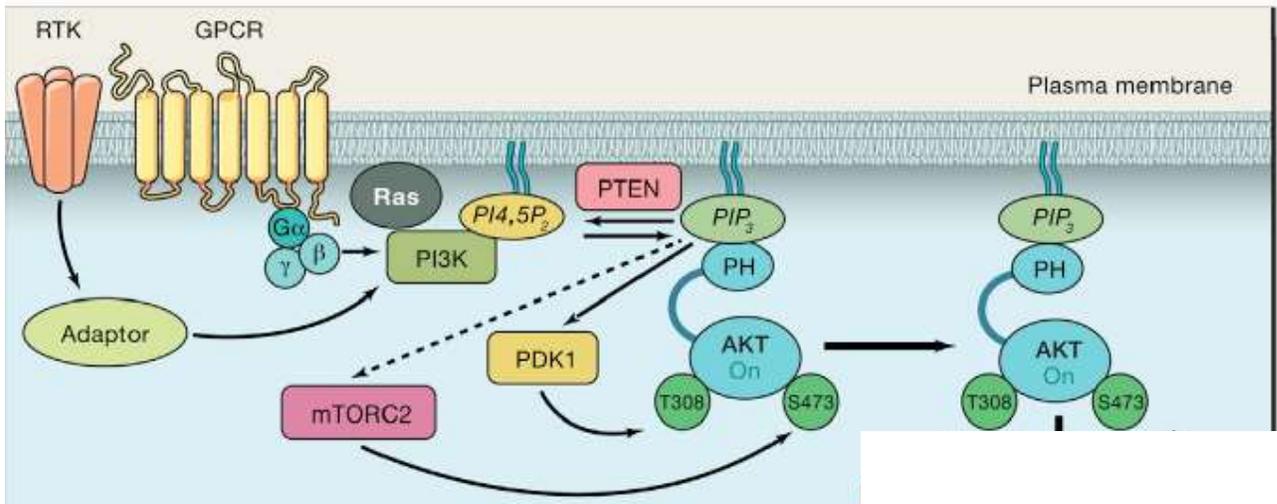
En 1991 tres laboratorios independientes caracterizaron y clonaron el homólogo celular de v-AKT una Serina/ Treonina cinasa de 57 kDa; también denominada proteína cinasa B (PKB) que inicialmente se caracterizó como oncogen nombrado por el retrovirus (agute transformant retrovirus) (Akt-B), se obtuvo del ratón que presentaba linfoma de células T y años más tarde se caracterizó el gen que codificaba para un proteína con actividad de cinasa. A la fecha se han identificado tres isoformas de Akt denominadas como AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB  $\beta$ ) y AKT3 (PKB $\gamma$ ), provenientes de tres genes distintos que se localizan en los cromosomas 14q32, 19q13, and 1q44, respectivamente [74].

La activación de la proteína Akt juega un papel importante en el crecimiento/tamaño celular, proliferación, supervivencia, metabolismo de glucosa, estabilidad genómica y neovascularización. Diversas investigaciones señalan que AKT está activa en una amplia variedad de tumores sólidos de origen humano y de igual manera puede promover el desarrollo de neoplasia malignas [75]. La organización estructural de esta enzima consiste en un dominio de homología a la plectrina (PH) el cual está altamente conservado, un dominio catalítico con actividad de cinasa (KD) y un dominio regulatorio (RD) ubicado en el carboxilo terminal (Fig. 9).



**Fig 9. Estructura de las tres isoformas de AKT/PKB. AKT también llamada PKB tiene 3 isoformas y cada una puede ser fosforilada en sitios específicos por la cinasa PDK1 y el complejo mTORC2. Fuente: [76]**

La activación de AKT está regulada por PI3K, de la integridad del dominio PH que es el sitio de anclaje con la membrana células y de la fosforilación en la Thr 308 por PDK y Ser 473 por mTORC2 siendo esta última fosforilación la que activa completamente a AKT (Fig. 10).



**Fig. 10 PI3K/AKT. Fuente: [74]. AKT se recluta cuando PI3K hace su función, permitiendo que AKT sea fosforilada para su activación.**

La inactivación de AKT está mediada por dos fosfatasa: PP2A la proteína fosfatasa 2A que defosforila el sitio T308 y PHLPP la proteína fosfatasa con dominio PH y muchas repeticiones de leucina que defosforila S473. Estos son los mecanismos más comunes de inactivar AKT pero existen otras formas de modulación negativa, por ejemplo, la proteína CTMP (proteína moduladora carboxi-terminal), y HSP90 (proteína 90 head-shock) previenen las fosforilaciones de AKT [74].

### 1.20 Efectos de AKT

AKT tiene múltiples efectos reportados, a continuación se mencionarán los efectos más relevantes [74] y se presentan en la figura 11. El efecto proinflamatorio y de supervivencia es debido a que AKT fosforila y activa a IKK (IκB Kinase) el cual induce la degradación del inhibidor de NF-κB (factor nuclear Kappa B). El factor NF-κB promueve la inflamación permitiendo que se transcriban genes de la respuesta inflamatoria como interleucinas proinflamatorias.

Efecto proreplicativo o proliferativo. El ciclo celular esta regulado por ciclinas dependientes de cinasas (CDKs), ciclinas y de inhibidores del complejo CDK/ciclina. AKT previene la degradación de la ciclina CD1 al inhibir a GSK3 la cinasa sintetizadora de glucógeno, que normalmente fosforila a CD1, que es un requisito para su degradación por el proteosoma. De hecho, si bloquea la via PI3K/AKT, causas paro del ciclo celular. El efecto sobre GSK3 es tan importante que se ha reportado que es uno de los principales efectos de AKT [77].

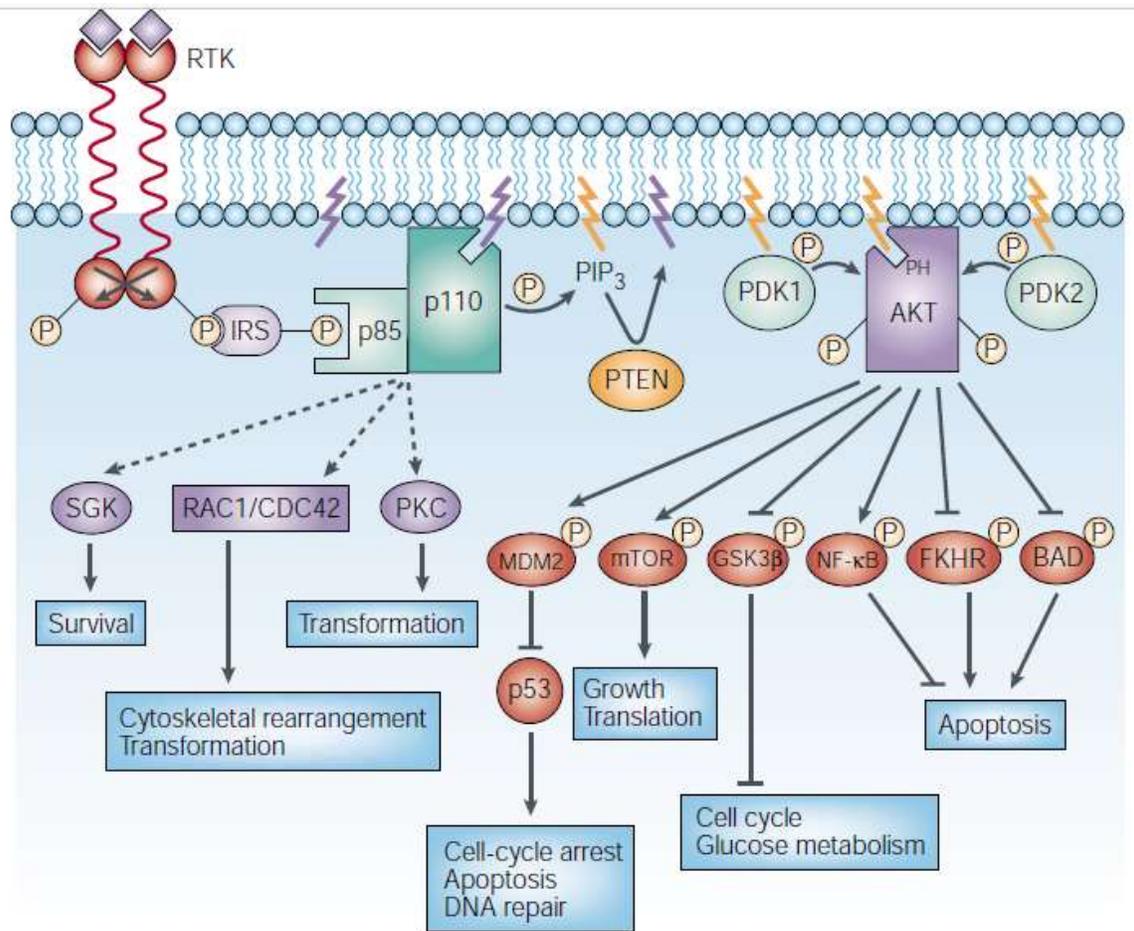
La GSK3 fosforila predominantemente proteínas previamente fosforiladas, ya que la proteína tiene un bolsillo que detecta un grupo fosfato. El fosfato que añade AKT en GSK3 crea un pseudosustrato, impidiendo que el bolsillo sea llenado con el fosfato proveniente de otra proteína. En ausencia de señales GSK3 está activa, la fosforilación de los blancos de GSK3 encargados de la limitación de la supervivencia celular o proliferación. Los productos fosforilados de GSK3 son reconocibles por la ligasa de ubiquitina que añade una señal para que posteriormente se degrade en el proteosoma. Algunos otros ejemplos de blancos de GSK3 son: BCL-2 y c-Myc. GSK3 tiene tal efecto en la célula que ratones knock out carentes de AKT no pueden sintetizar glucógeno en el músculo [74].

AKT tiene un efecto anti-apoptótico al mediar el control negativo o inhibitorio de los niveles de p53 al unirse a MDM2, proteína que promueve la degradación de p53. P53 activa la transcripción de genes asociados al control del ciclo celular y asociados a apoptosis y al inhibir su efecto permite que la célula siga viva y promoviendo el ciclo celular.

Otro efecto anti-apoptótico que impacta en la célula de manera contundente es que AKT fosforila los factores de transcripción FoXO, los cuales controlan un diverso grupo de genes que responden ante la adaptación y estímulos de insulina bajos. Cuando AKT fosforila a FoXO permite que sea éste reconocido por proteínas 14-3-3, lo cual promueve que el complejo sea secuestrado en el citosol. De esta manera AKT suprime la expresión de los blancos de FoXO, cuyas funciones son proapoptóticas, paran el ciclo celular, inhiben el catabolismo y crecimiento y promueve cambios metabólicos en tejidos específicos [78].

Por otra parte, AKT también activa el complejo proteína cinasa mTORC1, que estimula procesos de biosíntesis promoviendo el crecimiento celular. AKT solamente tiene que fosforilar e inhibir TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa), también conocido como tuberina. La proteína llamada Rheb que se encuentre en la cara citoplasmática del lisosoma, con actividad de GTPasa y puede presentar dos formas: GDP y GTP. TSC2 es afín a la forma GDP de la proteína Rheb secuestrándola, y al fosforilar AKT a TSC2 la inhibe, permitiendo la liberación de Rheb para cambiar a la forma GTP, la cual es afín al complejo mTORC1. En ausencia de factores de crecimiento, el complejo TSC mantiene secuestrado y en estado GDP a Rheb incapaz de unirse a mTORC1 [79].

La actividad de mTORC1 promueve la síntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos, catalogado como un proceso anabólico. El complejo mTORC1 suprime el estímulo de AKT, promoviendo la degradación de IRS1 y 2 por múltiples fosforilaciones en residuos de serina. También fosforila y activa a GRB10 (proteína 10 del receptor de factores de crecimiento) que inhibe la señalización de RTKs, estabilizando el receptor, atenuando la señal [80].



**Fig. 11 Funciones de AKT hasta el 2002. AKT actúa fosforilando y activando a MDM2 que inhibe a P53 promoviendo el ciclo celular, fosforila y activa el complejo mTOR promoviendo el crecimiento celular, fosforila e inhibe a GSK3  $\beta$  lo que promueve el ciclo celular, fosforila al factor NF  $\kappa$ B lo cual evita la apoptosis, fosforila e inhibe al factor Fork Head actuando en su receptor FKHR evitando la apoptosis, fosforila e inhibe la proteína proapoptótica BAD evitando la apoptosis entre muchos otros efectos. Fuente: [72].**

### 1.21 Investigación científica vs cáncer

Sin duda alguna el origen del cáncer es multietiológico y entre los factores involucrados se encuentran la prolongada estimulación con hormonas (estrógenos en cáncer de mama y andrógenos en cáncer de próstata), infección por virus, carcinógenos químicos, radiación, inflamación persistente, eventos genéticos adquiridos o innatos y aneuploidias. De igual manera, el cáncer se considera como una afección genética en la que participan oncogenes que se activan como

resultados de procesos de amplificación o por mutaciones de tipo puntual o bien aberraciones cromosómicas que alteran la expresión y funcionamiento de oncogenes y proteínas supresoras de tumores. Todas estas alteraciones derivan en un sin número de modificaciones en vías de transducción de señales, en particular, las proteínas cinasas que resultan sobre expresadas o bien muestran una pérdida en los mecanismos de regulación. Cuando las mutaciones somáticas ocurren en residuos conservados o se presentan en puntos de acceso debido a que de manera constitutiva sobre-regulan la actividad de la proteína cinasa [81]. Finalmente, la inestabilidad genética refleja una elevada actividad de las proteínas cinasas aumentando de esta manera el funcionamiento de las vías de señalización y activando diferentes mecanismos. Por otra parte, defectos en las vías de vigilancia que contribuyen a mantener la integridad genómica puede ocasionar amplificaciones en diferentes regiones cromosomales o producir re-arreglos cromosomales complejos, que a su vez resultan en defectos en la expresión de proteínas cinasas y los consecuentes cambios epigenéticos, transcripcionales y post-transcripcionales como el empalme alternativo y la expresión miRNA. La idea de diseñar un fármaco mágico para la cura del cáncer ha variado con el tiempo debido al amplio espectro de modificaciones que se producen en las células tumorales, por este motivo el pensamiento ha evolucionado a diseñar terapias que incluyan el uso de múltiples inhibidores de proteínas cinasas [82, 83].

### **1.22 Productos naturales en la Terapéutica contra el cáncer**

La búsqueda de agentes capaces de combatir el cáncer ha sido ampliamente evaluada en compuestos obtenidos de plantas y esta investigación se remonta desde los orígenes de la civilización y en 1950 se descubrió y desarrolló a partir del té de vinca los alcaloides vinblastina y vincristina y el aislamiento de podofilotoxinas citotóxicas [84, 85]. Aproximadamente desde 1940 hasta finales del 2014, se habían descubierto 175 compuestos no sintéticos de origen vegetal. En 1982 se mostró que quercetina y polifenoles relacionados inhibían a la proteína caseína-quinasa 2 (CK2) [86, 87]. Graziani [86] trabajando en su laboratorio de Patología de la Universidad de Colorado, encontró que la quercetina inhibía la actividad de la fosfotransferasa en

virus del sarcoma de Rous producto del gene pp60src. Por otra parte, alcaloides bacterianos como la estaurosporina mostraron actividad contra la proteína cinasa C en rangos de concentración nanomolar [88]. Transcurrieron treinta y cinco años para mostrar que los bioflavonoides y otros productos naturales regulan la actividad de un gran número de cinasas.

Por la importancia de sus efectos en la regulación de cinasas y en la inhibición del crecimiento de tumores, la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobó 40 drogas dirigidas contra proteínas cinasas [89]. Aproximadamente 150 drogas contra proteínas cinasas están en fase de prueba clínica y muchos inhibidores específicos están en fase pre-clínica para el desarrollo de drogas. Es interesante resaltar que inhibidores de proteínas cinasas muestran un gran número de blancos en el kinoma humano. Por lo tanto, no es sorprendente que inhibidores de cinasas pudieran afectar otras moléculas de señalización relevantes en otras enfermedades.

Desde la antigüedad hasta nuestros días se han utilizado productos naturales en el ámbito de la medicina que se obtienen de plantas, animales y microorganismos. Fue hasta el siglo XIX que se logró identificar a los ingredientes activos obtenidos de fuentes naturales entre los que encontraron la morfina, salicina, emetina, estriquina, colchicina, cafeína, nicotina y cocaína entre otros. Newman [90] estima que 60% de los fármacos que están disponibles actualmente derivan de productos naturales. En la actualidad los inhibidores de proteínas cinasas derivan de diferentes compuestos entre los que se encuentran los flavonoides, alcaloides, sesquiterpenos, diterpenos y polifenoles que se obtienen de plantas y vegetales y que muestran actividades anti-tumorales, en China se prescriben para el tratamiento de la leucemia mieloide. Por otra parte, el compuesto Danggui Longui Wan es la mezcla de 11 medicinas herbales y de esta mezcla se caracterizó el compuesto activo contra la leucemia denominado indirubina [91]. En la actualidad se demostró que la indirubina y sus análogos inhiben a las cinasas dependientes de ciclina (CKD), enzimas responsables de la regulación del ciclo celular. Sin embargo, un problema de estos compuestos es su biodisponibilidad debido a su deficiente absorción, degradación o modificaciones estructurales. Es por este motivo que la mezcla de indirubina con los otros componentes ayudan a aumentar la disponibilidad y solubilidad de otras

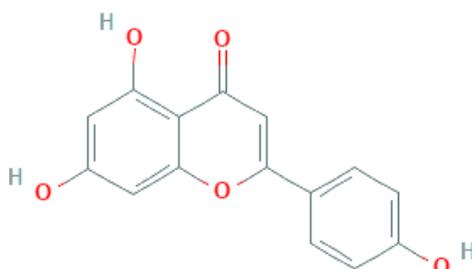
moléculas que inherentemente son insolubles. Entre los efectos más relevantes de los productos naturales se encuentra la interacción con moléculas involucradas en vías de señalización entre las que se encuentran: PI3K/AKT/mTOR/GSK3, Ras/Raf/MEK/MAPK/ERK1/2, PL-C/PKC/CaMKII/IV o JNK.

### 1.23 Estructura y actividad biológica de los flavonoides

Los polifenoles son conocidos por sus propiedades anti-oxidantes regulando a las cinasas por su interacción con el sitio de fijación del ATP. Estudios realizados *in silico* muestran que la apigenina y luteolina inhiben a la proteína cinasa CK2 delta que es una serin/treonina cinasa que participa en la vía de señalización de AKT [92, 93]. Los flavonoides se clasifican en seis grupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas y antocianinas [94]. Presentan un amplio espectro de actividades antitumorales como inhibición del crecimiento celular, apoptóticos, inhibición de la invasión tumoral y la inhibición de actividades de proteínas cinasa.

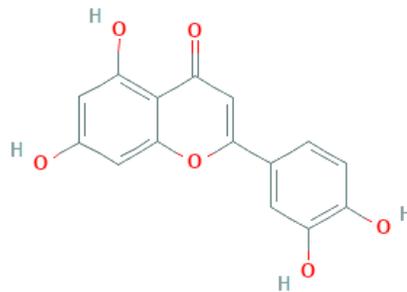
**Flavonas** se han realizado estudios con apigenina, luteolina y baicaleina.

**Apigenina** es una flavona presente en el cilantro, cereales y manzanilla. Entre sus efectos, destaca que inhibe a PI3K/AKT/mTOR, bloquea también la activación de IKK $\alpha$ , y retrasa el progreso del cáncer de próstata. [92, 95, 96].



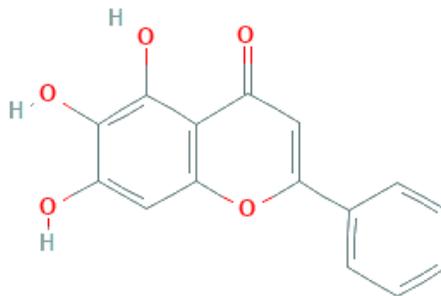
**Fig. 12 Apigenina. Fuente: [97]**

**Luteolina:** inhibe la proliferación regulando la vía MAPK y mTOR en diversas líneas celulares [98].



**Fig. 13 Luteolina. Fuente:** [97]

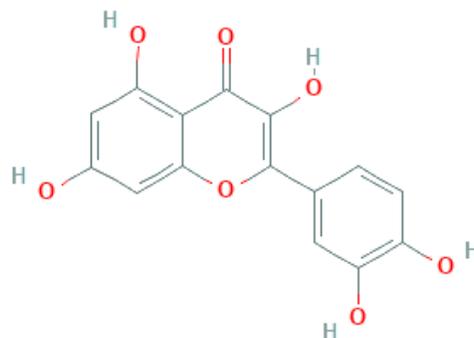
**Baicaleina:** presente en *Scutellariae radix*, la baicaleina regula el ciclo celular inhibiendo a las ciclinas dependientes de cinasas, también inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno y a proteínas cinasas entre las que se encuentran MAPK, AKT y mTOR [99].



**Fig. 14 Baicaleina. Fuente:** [97]

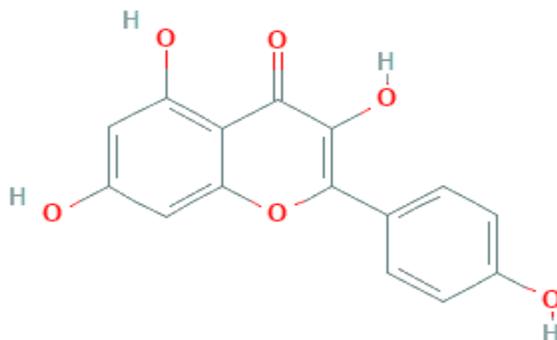
**Flavonoles:** entre los que se encuentran quercetina, kaempferol y fisetina.

**Quercetina:** está presente en las manzanas, moras, cebollas rojas, cereza, brócoli y cilantro. Inhibe cinasas con actividad de serina/treonina, AKT, mTOR, MAPK, ERK1/2, JNK. Lo que sugiere que inhibe a miembros de vías de supervivencia [100].



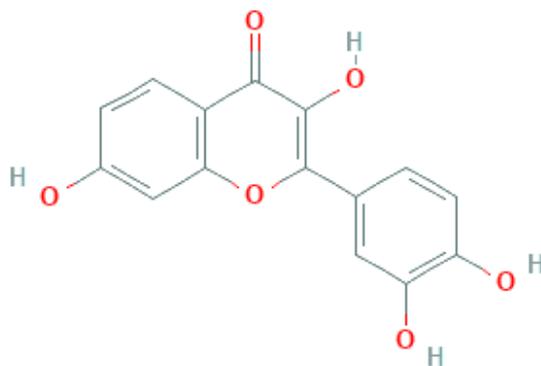
**Fig. 15 Quercetina. Fuente:** [97]

**Kaempferol:** se encuentra en las manzanas, uvas, tomates, té verde, cebollas y brócoli. Inhibe la angiogénesis regulando el receptor-2 para VEGF y regulando las vías PI3K/AKT, MEK y ERK. También inhibe la migración de células de cáncer renal a través de la regulación de las vías AKT y FAK [101]. Así mismo, incrementa la apoptosis en células HeLa mediante la vía PI3K/AKT y hTERT [102, 103].



**Fig. 16 Kaempferol. Fuente: [97]**

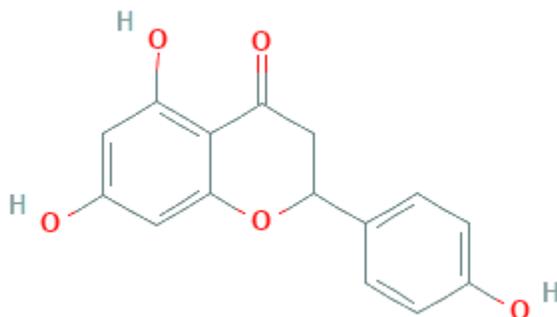
**Fisetina:** está presente en fresas, manzanas, cebollas, caquis y pepinos. Presenta actividad anti-carcinogénica con efectos en carcinoma de mama mediante la regulación de la vía PI3K/AKT/mTOR [104]. Inhibe el carcinoma de laringe a través de la regulación de AKT/NF- $\kappa$ B/mTOR y ERK 1/2 [105]. Así mismo, induce apoptosis en cáncer de pulmón a través de la vía MAPK [106].



**Fig. 17 Fisetina. Fuente: [97]**

**Flavanonas:** entre las que se encuentran naringenina.

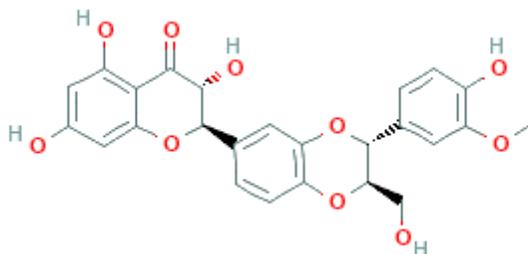
**Narigenina:** presente en los cítricos. Muestra citotoxicidad en cáncer de mama, estómago, hígado, cérvico-uterino, páncreas, colon y leucemia. Induce muerte celular en cáncer de próstata mediante la vía PI3K/AKT y MAPK [107]. Además inhibe la proliferación celular, migración e invasión en cáncer gástrico mediante la inhibición de la vía AKT [108].



**Fig. 18 Narigenina. Fuente:** [97]

**Flavanonoles:** entre los que se encuentran silibinina y Taxifolina

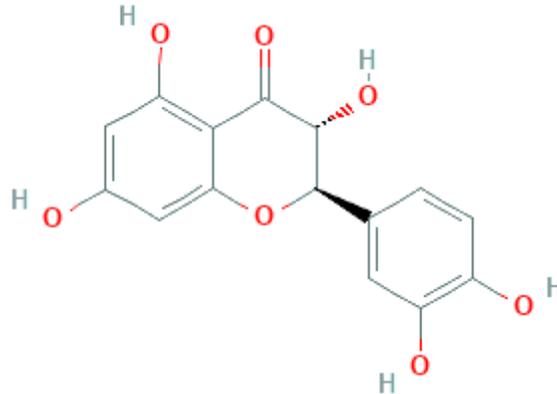
**Silibinina:** se obtiene de las semillas y frutos de la leche de cardo *Silybum marianum* que contiene una mezcla de tres isómeros estructurales silibinina, silidianina y silicristina. La silibinina induce el arresto del ciclo celular en fase G<sub>1</sub>, apoptosis y activa la vía JNK/SAP en células de cáncer de páncreas [109]. Se ha demostrado también que el tratamiento combinado con sorafenib y silibinina de actúa de manera sinérgica contra el carcinoma hepatocelular y de células madre mediante la inhibición de la -fosforilación de la vía STAT3/ERK/AKT [110].



**Fig. 19 Silibinina. Fuente:** [97]

**Taxifolina:** es un compuesto presente en las coníferas como el alerce siberiano *Larix sibirica*, en Rusia, *Pinus roxburghii*, *Cedrus deodara* y en China el tejo, *Taxus*

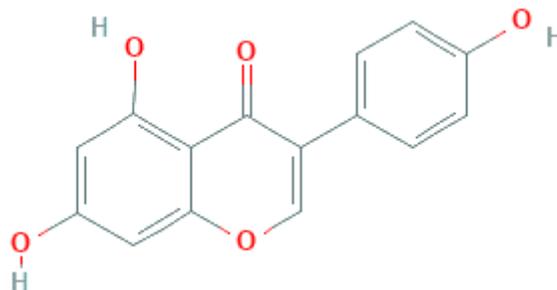
*chinensis* var. *Mairei* inhibe el crecimiento y migración de osteosarcoma y suprime la carcinogénesis en células de piel [111, 112].



**Fig. 20 Taxifolina. Fuente:** [97]

**Isoflavonas** entre las que se encuentra la genisteína y daidzeína que se encuentran en los frijoles y soya.

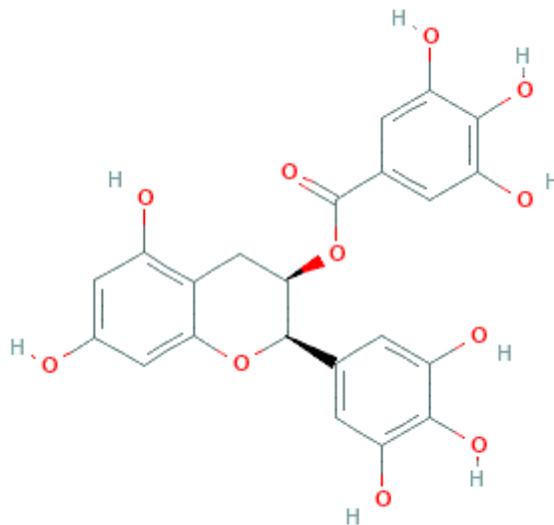
**Genisteína:** reduce la activación de AKT y EGFR y la producción de IL-6 en células de colangiocarcinoma -cáncer de las vías biliares- dependiente e independiente de receptores a estrógenos [113]. La inactivación de AKT, ERK y NFκB por genisteína reduce la oncogenicidad en carcinoma de ovario [114]. Además, se ha demostrado que la genisteína inhibe el crecimiento y regula la migración e invasividad en células de melanoma por la vía de FAK/paxilina y la MAPK [115]. Tomando todo en consideración, genisteína actúa como un quimioterapéutico contra diferentes tipos de cáncer, alterando la apoptosis, el ciclo celular y angiogénesis e inhibiendo la metástasis. Los efectos terapéuticos de genisteína resultan de sus acciones sobre ERK ½, MAPK, NFκB y PI3K/AKT.



**Fig. 21 Genisteina. Fuente:** [97]

### Catequinas o flavanoles:

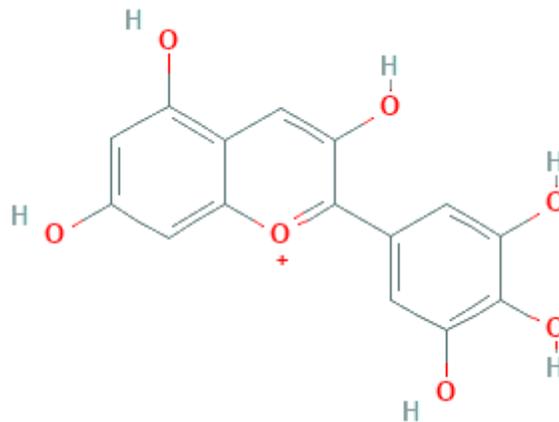
**Epigallocatequina-3-galato** se encuentra en alta concentración en las hojas secas del té verde, té blanco y té negro. Participa en la inhibición de la angiogénesis en cáncer de endometrio [116]. Así mismo, promueve apoptosis en las células T47D de cáncer de mama a través de la inhibición de la vía PI3K/AKT [117]. Promueve la degradación de la sobreexpresión de P-glicoproteína inducida por doxorubicina, inhibiendo la vía PI3K/AKT y MEK/ERK [118]



**Fig. 22 Epigallocatequina-3-galato. Fuente:** [97]

### Antocianinas.

**Delfinidina:** es un pigmento de las plantas, actúa también como antioxidante se encuentra en arándanos y uvas. Este flavonoide promueve apoptosis e inhibe la transición epitelio-mesénquima mediante la inhibición de la vía ERK/p38 en líneas celulares de osteosarcoma [119]. Influyen también en la proliferación de células de cáncer ovárico inhibiendo la vía de PI3K/AKT y ERK1/2 [120].

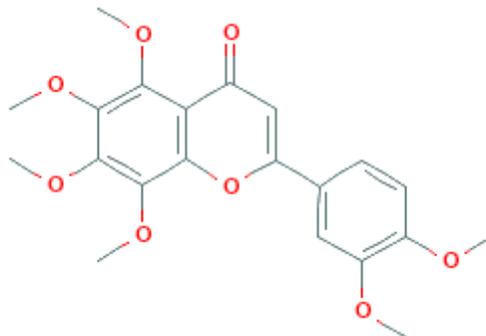


**Fig. 23 Delphinidina. Fuente:** [97]

#### 1.24 Actividad biológica de la nobiletina

##### **Nobiletina: (5, 6, 7,8,3',4'-hexametoxiflavona)**

La nobiletina es una polimetoxiflavona que se obtiene de los cítricos en particular de las frutas del género *Citrus*. El análisis cristalográfico de la molécula muestra que el benzopirano y los anillos de hidrocarburo aromáticos se encuentran en el mismo plano, mientras que los átomos de carbono de los cuatro grupos metoxi unidos al anillo benzopirano no están en paralelo. La nobiletina es fácilmente absorbida, debido a su alta naturaleza lipofílica y alta permeabilidad [121, 122]. Este compuesto muestra diversos efectos fisiológicos entre los que se encuentran anti-carcinogénico, anti-inflamatorio, anti-oxidante, anti-resistencia a insulina, anti-osteoclastogénesis, protección cardiovascular y neuroprotección [123-133].



**Fig. 24 Nobiletina. Fuente:** [97]

-La Tabla 3 contiene las líneas celulares donde la nobiletina tiene efecto y a continuación se enuncian. En la línea celular PC12 derivada de feocromocromocitoma inhibe la agregación autoinducida de  $\beta$  amiloide, molécula que contribuye al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, induce sobre-expresión de las subunidades del receptor N-metil-D-aspartato y la expresión de c-Fos en células en la línea celular PC12D [134] y aumenta la actividad de PKA/ERK/MEK/CREB. En fibroblastos disminuye la expresión de MMP-9 y la actividad de MAPK y p-p38 [135]. En cáncer muestra una amplia variedad de efectos. En células de la línea celular SK-N-SH de neuroblastoma, la nobiletina significativamente reduce la expresión de la proteína de interacción con tioredoxina, que es un factor crucial en el estrés a retículo endoplasmático, resultando en la apoptosis celular [136]. Por otra parte, en células AGS obtenidas de adenocarcinoma gástrico, la nobiletina regula la expresión de MMP-2, MMP-9, c-Raf, Ras, Rac-1, RhoA y Cdc43 mediante la inhibición de la vía PI3K/AKT, activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y de NF $\kappa$ B [130]. Se ha reportado también que la nobiletina inhibe la proliferación en células SNU-16 mutadas en p53 y derivadas de cáncer gástrico humano. Arresta el ciclo celular en fase sub-G<sub>1</sub>, incrementa la expresión de caspasa-3 y caspasa-9, promueve la formación del complejo Bax/Bcl-2, la degradación de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) e induce la apoptosis celular. De igual manera, se ha determinado que muestra efectos sinérgicos anticancerígenos con el 5-fluorouracilo [128]. En células de cáncer hepático, la nobiletina inhibe de manera significativa la proliferación celular, arresta las células en fase G<sub>2</sub>, promueve la degradación Bcl-2 y la expresión de COX-2, induce la expresión de Bax y caspasa-3 en células SMMC-7721[137]. En leucemia mieloide aguda el estudio en células AML, mostró que para el ciclo celular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> mediante la regulación de ERK, incrementa la apoptosis a través de la activación de caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9 estimulando la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) en la línea celular HL-60 y regula la proliferación celular en varias líneas celulares [138]. Disminuye el riesgo de cáncer de próstata, en células PC-3 la nobiletina reduce la viabilidad celular, regula la expresión de VEGF y NF- $\kappa$ B mediante la regulación de la vía de señalización AKT/HIF-1 $\alpha$ . Efectos

en células menos metastásicas como las denominadas DU-145, la nobiletina disminuye la expresión de c-Myc y la actividad de p50 en el núcleo [139]. Se ha encontrado que nobiletina muestra efectos contra 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b]piridina- (PhIP), fármaco que induce carcinogénesis en próstata, mostrando que los niveles de estrógeno, leptina y testosterona no varían con el grupo control. Sin embargo, la multiplicidad de la incidencia de adenocarcinomas de próstata en ratas F344 disminuye en respuesta al tratamiento con nobiletina [140].

En células MDA-MB-231 provenientes de cáncer de mama, la nobiletina regula la transcripción de MMP-9 y CXCR4 mediante la disminución de las vías de MAPK y NFκB, lo que provoca una inhibición en la metástasis e invasividad [123]. En las células OVCAR-3 y A2780/CP70 derivadas de cáncer de ovario, la nobiletina inhibe la proliferación celular y la expresión de VEGF [141]. En HER-2 positivas, SK-BR-3 MCF7 receptor a hormona positivo y en la triple negativa MDA-MB-468, la nobiletina promueve el arresto en ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> por la inhibición de ERK ½ y ciclina D1 y la estimulación de p21 de una manera dependiente de la dosis. Así mismo, la nobiletina promueve apoptosis mediante la disminución en la expresión de Bcl-xL, AKT y mTOR en células MDA-MB-468 sin cambiar la expresión de Bax [142]. En las células H1299 y A549 obtenidas de un adenocarcinoma de pulmón, la nobiletina inhibe la transición epitelio-mesénquima inducida por TGF-β, mediante la inhibición en la expresión de p-Src, p-paxilina, p-FAK, MMP-2, MMP-9, slug, snail, ZEB1 y twist. De igual manera, la nobiletina disminuye la actividad de Smad sin producir cambio en la fosforilación y translocación de Smad inducida por TGFβ. Se demostró que la sobreexpresión de Smad3 abroga el efecto de la nobiletina en la transición epitelio – mesénquima estimulados por TGFβ1 [143, 144]. En carcinoma nasofaríngeo, la nobiletina inhibe la capacidad de migración en las líneas celulares NPC-BM y HONE-1, mediante la inhibición de la expresión de MMP-2, NF-κB y AP-1 y aumento en la expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 [145]. Por otra parte, la nobiletina muestra importantes efectos en la inhibición de la motilidad, migración e invasión en las células HOS y U2OS derivadas un osteosarcoma, en donde inhibe la expresión de MMP-2 y MMP-9 mediada por ERK/JNK y la inactivación de CREB, SP-1 y NFκB [146].

### 1.25 Metabolismo de la nobiletina

Los flavonoides son metabolizados por las enzimas de la familia de citocromo P450 CYP1, lo que conduce a la activación de metabolitos que muestran un amplio espectro de efectos biológicos. En células MCF7 obtenidas de adenocarcinoma de mama las enzimas CYP1 convierten a nobiletina en el metabolito O-demetilnobiletina [124]. Hay siete metabolitos mayoritarios O-demetilnobiletina: 3'-demetilnobiletina, 4'-demetilnobiletina, 3'4'-didemetilnobiletina, 5-demetilnobiletina, 5,3'-didemetilnobiletina, 5,4'-didemetilnobiletina y 5,3',4'-tridemilnobiletina que son excretados en la orina de ratones tratados con el flavonoide [147]. Estos metabolitos exhiben actividad anti-inflamatoria y pro-apoptótica en ratones tratados en azoximetano/DSS. Sin embargo, la concentración en colon es 20 veces por debajo de la original, los tres metabolitos 3'-demetilnobiletina, 4'-demetilnobiletina y 3',4'-didemetilnobiletina, siendo este último el que presenta mayor actividad. Estos estudios sugieren el papel que tiene la demetilación en el C-3' y C-4' en inhibir la carcinogénesis de colon y presenta también efectos anti-oxidativos y anti-inflamatorios, así como actividades neuroprotectoras atenuando la actividad de NF-kB, inhibiendo a especies reactivas de oxígeno y sobre-expresando a HO-1, con la consecuente activación de ERK, AKT y JNK.

**Tabla 3. Efectos biológicos de la Nobiletina en cáncer**

<b>Tipo de Cáncer</b>	<b>Línea celular</b>	<b>Efectos Biológicos</b>	<b>Referencia.</b>
Carcinoma de ovario	A2788/T	↓el flujo del transportador ABCB1 ↓AKT, ERK, Nrf2	[148]
Adenocarcinoma gástrico	AGS	↓MMP2, MMP9, c-Raf, Ras, Rho A, Cdc42, vía PI3K/AKT; activación de FAK y NF-kB	[130]
Glioma	C6	↓Proliferación celular, actividad de Ras, vía MEK/ERK	[149]
Carcinoma de pulmón de células no pequeñas	H1299, A549	↓ EMT, p-Src, p-paxilina, p-FAK, MMP2, MMP9, slug, sna1, ZEB1.	[144]

Hepatocarcinoma	HepG2	↓ApoB secreción síntesis de colesterol↓, síntesis de triglicéridos↓	[144]
		Dislipidemia↓, resistencia a la insulina↓, aterogénesis↓, apoB100↓, MAPKerk↑, LDLR↑, MTP↓, DGAT1/2↓, Pgc1α↑, Cpt1α↑, β-oxidación↑	[150]
Leucemia	HL-60	ERK↓, caspasa-3↑, caspasa-9↑, caspasa-8↑, MAPK↑	[138]
Osteosarcoma	HOS y U2OS	ERK/JNK↓, MMP-2↓, MMP-9↓, CREB↓, SP-1↓, NF-κB↓	[146]
Cáncer de mama	MDA-MB 231	MMP-9↓, CXCR4 ↓, MAPKs↓, NF-κB↓	[151]
	MDA-MB 468	ERK1/2↓, ciclina D1↓, p21↑, Bcl-xL↓, Akt↓, mTOR↓	[142]
Carcinoma [152] de ovario	OVCAR-3, A2780/CP70	Viabilidad Celular↓, proliferación↓, VEGF↓	[153]
Carcinoma de próstata	PC-3	Viabilidad celular↓, VEGF↓, NF-κB↓, AKT/HIF-1α↓  ↓Myc y p50	[139]

	DU-145		
--	--------	--	--

### **1.26 Línea celular FaDu de carcinoma escamoso hipofaríngeo**

La línea celular usada en este trabajo catalogada como FaDu ATCC HTB-43 (ATCC American Type Cell Culture). Un carcinoma escamoso proveniente de tejido de faringe de un varón caucásico de 56 años, tiene morfología epitelial, con propiedades adherentes y es capaz de producir tumores [152]. No fue hasta 1972 que se reportó la caracterización de esta línea celular [154].

El ATCC pone a la venta un panel de células que representan el cáncer de cabeza y cuello para diversos tipos de pruebas, entre las células se encuentra la línea celular FaDu, tres diferentes carcinomas de lengua, un carcinoma de glándulas salivales y otro carcinoma de faringe infectado con HVP. Otras líneas disponibles son FaDu-Luc2 con el gen de la luciferasa para inoculación *in vivo*, la línea 2 A3 que fue infectada con HVP, la sepa Detroit 562 que es un carcinoma faríngeo procedente de metástasis, Hs840.T que son fibroblastos infectados con HVP y UPIC un carcinoma escamoso recurrente pero procedente de un paciente infectado con HVP y obtenido de metástasis, muy agresivo [155].

Todas las líneas celulares tienen diferentes aplicaciones desde probar pequeñas moléculas para desarrollo de fármacos hasta comprender alteraciones genéticas que las caracterizan. La línea celular FaDu a diferencia de las otras líneas, muestra una mayor facilidad para generar tumores y muestra ser un buen hospedero para la transfección de genes de interés. Estas dos características permiten usar la línea celular para ensayos de viabilidad y proliferación, se pueden desarrollar esferoides para evaluar modelos tridimensionales *in vitro* y son susceptibles a la transfección con vectores acoplados a luciferasa para evaluar la expresión de moléculas proinflamatorias, factores de crecimiento entre muchos otros blancos de investigación.

## **2 Justificación.**

Se ha establecido que el carcinoma de células escamosas de hipofaringe es uno de los más frecuentes que se presentan en cabeza y cuello. Las personas afectadas con este tipo de cáncer pueden experimentar aumento de ganglio linfático en cuello, obstrucción de vías respiratorias, dificultad al respirar, mal aliento, dolor de oído, dificultad al tragar, pérdida de peso y fatiga. Por otra parte, la supervivencia de pacientes que tiene este carcinoma está en relación con el estadio en que ha sido detectado y el tratamiento consiste en radio y/o quimioterapia, inmunoterapia o procedimientos quirúrgicos agresivos como laringectomía parcial o total. Desafortunadamente y a pesar del amplio espectro de protocolos para el tratamiento de esta patología a la fecha no se cuenta con un procedimiento exitoso; por este motivo un gran número de investigaciones están encaminadas en la búsqueda de tratamientos alternativos. Entre los compuestos que han sido exhaustivamente estudiados se encuentran los flavonoides, que presentan una diversa gama de funciones entre las que incluye su actividad anti-carcinogénica, entre otros. Dentro del grupo de los flavonoides existe un grupo de metoxiflavonas entre las que se encuentran la nobiletina, sinensetina y naringina que por sus propiedades físico-químicas son un grupo de compuestos liposolubles que a bajas concentraciones muestran actividades biológicas; por este motivo en el trabajo se evaluó el efecto de la nobiletina sobre la supervivencia del carcinoma escamoso de hipofaringe, así como la migración, angiogénesis, apoptosis y vías de señalización.

## 2.1 Objetivo General.

- Evaluar la supervivencia de la línea celular FaDu *in vitro* determinando el efecto de la nobiletina sobre la apoptosis, angiogénesis, proliferación y migración.

## 2.2 Objetivos particulares.

- Confirmar el efecto de la nobiletina en la viabilidad de la línea celular FaDu, determinando la concentración inhibitoria usando el ensayo de MTT.
- Comprobar que nobiletina tiene efectos en la migración de la línea celular FaDu usando los ensayos de Transwell (cámara de Boyden) y Wound Healing (cicatriz – herida).
- Evaluar qué actividad tiene la nobiletina en la vía de señalización PI3K/AKT en modelos temporales y de gradientes de concentración usando Western Blot.
- Caracterizar la actividad en la expresión o estado de las enzimas: PTEN, ERK y JNK, mediante RT-PCR para el primero y Western Blot para las demás proteínas.
- Evaluar el efecto de la nobiletina en la formación de cuerpos apoptóticos mediante el ensayo de TUNEL.
- Confirmar el efecto de la nobiletina en la producción y liberación de VEGF en el medio mediante Western Blot y ELISA.

## 2.3 Hipótesis

El flavonoide nobiletina al internalizarse en las células cancerígenas (FaDu) tendrá interacciones con las enzimas o sustratos responsables de propagar los estímulos de proliferación, angiogénesis, apoptosis y migración celular. Disminuyendo la supervivencia de las células cancerígenas.

## 2.4 Materiales y métodos.

### 2.4.1 Equipo

Agitador magnético

Balanza (Sartorius)

Baño (Riossa)

Baño seco (Thermolyne),

Cajas de cultivo celular (Falcon, 6 y 96 pozos) (Corning)

Caja de cultivo celular 200mL (Corning)

Cámara de electroforesis vertical (Amersham Biosciences Hoefer)

Cámara de transferencia (Bio-Rad)

Campana de flujo laminar (The Baker Company)

Centrífuga (Thermo Scientific)

Espectrofotómetro (Optizen)

Fuente de poder para cámara de transferencia (Bio-Rad)

Fuente de poder para cámara de electroforesis (Bio-Rad)

Incubadora (SANYO)

Lector de placas (BioTek)

Microscopio de objetivos invertidos (Olympus CK2)

Micropipetas (Eppendorf, Gilson)

Sonicador (Ultrasonic Processor)

Tubos clínicos (15 y 50 ml) (Corning)

Tubos Eppendorf (Corning)

Refrigerador

Cámara de Neubauer

Cámaras de Boyden

kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology)

ELISA kit (Enzo)

Dead End Colorimetric TUNEL System (Promega)

Biospectrometro (Eppendorf)

Caset Oscuro

Vortex

Membranas de PVDF (GE Healthcare)

SuperScript III One-Step RT-PCR (Invitrogen)

Películas fotosensibles

Cuarto oscuro

Agitador orbital (Lab Line)

Termociclador (Perkin Elmer)

### 2.4.2 Reactivos

Buffer de lisis (Tris-HCl, NaCl, PMSF, Nonidet P-40, leupeptina, aprotinina, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NAF y Na<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)  
Wortmanina Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, Cloroformo, Alcohol isoamílico, Cloruro de sodio, SDS (Dodecilsulfato de sodio), Fosfato de sodio monobásico, Fosfato de sodio dibásico, Glicina, HCl 1M, Isopropanol, Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Nobiletina (Sigma) (pureza > 98%), Ortovanadato de sodio, Persulfato de amonio, Solución de referencia (pH=7,10,14), Trizma base, suero bovino fetal (SBF) , antibiótico-

antimicótico (Invitrogen), Colorante de Giemsa, Reactivo de Bradford, Soluciones de referencia de albumina de suero bovino, revelador de placas fotosensibles, fijador, Buffer de fosfatos salinos (PBS), CO<sub>2</sub>, Buffer de lavado, Buffer de desnudar, Buffer de Muestra, MTT (bromuro de azul de tiazol-tetrasolio), Ara C, DEPC (pirocarbonato de dietilo), Anticuerpos: anti-ratón, anti-cabra, anti-conejo, anti-pAKT Thr 308, anti-pAKT Ser473, anti-AKT, anti-pPI3K Tyr 199, anti-PI3K, anti-pERK Tyr 204, anti-ERK, anti-pJNK, anti-JNK, anti-β actina,

### 2.4.3 Programas de Cómputo

DIGI-DOC, GEN 5, GraphPad Prism, LabWorks, ImageJ.

## 2.5 Metodología.

### 2.5.1 Cultivo celular.

La línea celular de cáncer de hipofaringe FaDu (ATCC® HTB-43) se inoculó y mantuvo en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO BRL cat.no. 10099-141). inactivado por calor, y antibiótico-antimicótico (100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin) (GIBCO BRL cat.no. 15240-096) y se cambió cada dos o tres días. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.5.2 Ensayo de Viabilidad celular (MTT).**

Mediante la prueba de citotoxicidad con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; azul de tiazolilo) se evaluó el efecto de nobiletina en la viabilidad celular. Las células (10,000) se sembraron en cajas de 96 pozos con 50 µL de medio, que se incubaron durante 24 horas. Las células fueron tratadas a 24, 48 y 72 horas, con distintas concentraciones de nobiletina a 0,50, 100, 150, 200 y 300 µM y DMSO (dimetilsulfóxido) al 0.01% utilizado como vehículo para el ensayo. Al término del tratamiento, se añadieron 100 µL de MTT (solución preparada a una concentración  $5 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ ) y se incubó durante 4 horas a una temperatura de 37°C. Cuando el periodo de tiempo terminó, se absorbió el medio de cada pozo para agregar 50 µL de isopropanol ácido con el propósito de solubilizar los cristales de formazán para leerse a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro. Para el análisis se tomó como comparación el basal (100% de viabilidad) para obtener el porcentaje de células viables. Cada ensayo se elaboró en tres ocasiones por sextuplicado.

### **2.5.3 Tratamiento celular.**

Se utilizaron dos diferentes ensayos: Curso temporal a diferentes tiempos (15, 30, 60, 90, y 120 min) se expuso la línea celular FaDu a la misma concentración de nobiletina (50 µM), y gradiente de concentración donde por 24h se expuso la línea celular FaDu a diferentes concentraciones de nobiletina (10, 25, 50, 75 y 100 µM). Para los ensayos de migración celular se utilizaron 5,000 células. En los ensayos de inhibición de proteínas cinasa se incubaron durante 90 minutos antes del tratamiento con nobiletina. En todos los tratamientos utilizados en este estudio los controles fueron añadidos con dimetilsulfóxido, puesto que fue el vehículo usado para disolver la nobiletina.

### **2.5.4 Ensayo de Western Blot.**

Las células se sembraron en cajas de 6 pozos a diferentes dosis y tiempos con nobiletina, al término se retiró el medio de cada pozo y se reemplazó con 1 mL de PBS- 1mM de Ortovanadato de sodio con la ayuda de un gendarme se obtuvo el

paquete celular; se centrifugó el homogenizado resultante durante 10 minutos a 14,000 rpm, bajo una temperatura de 4°C. Al terminar el periodo de centrifugación, se lisaron las células retirando el sobrenadante y añadiendo 30 µL de Buffer de Lisis (Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM (PMSF), Nonidet P-40 1%, leupeptina 10µg/ml, aprotinina 50 g/mL, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.4 mM, NAF 10mM y Na<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10mM) para después sonicarlas sobre hielo por un periodo de 30 segundos a pulsaciones continuas de 30 Watts. Para realizar la cuantificación de proteína total se utilizó el método de Bradford con la ayuda de una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA; 15 µg/mL) a una longitud de onda de 595 nm y se prepararon 30 µg de muestra aplicando Buffer de carga (Azul de Coomasie 0.1%, β-mercaptoetanol 1 % , Tris 0.5M, SDS 10%, Glicerol 15%). Posteriormente, con el apoyo de un baño seco a 65°C por 10 minutos se desnaturalizaron las muestras preparadas para continuar a correr a 75 V por una hora en geles SDS-PAGE al 10% en cámara de electroforesis. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de difloruro de polivinideno (PVDF) usando una cámara semihúmeda a 25 V por una hora. Posteriormente se bloqueó 1 h utilizando una solución TBS 1X (Tris-HCl 5M pH 7.5 y NaCl 1.5M) con leche libre de grasa al 5% con el propósito de evitar uniones no específicas a la membrana en movimiento constante. Después de terminar con el bloqueo de la membrana se realizaron tres lavados (de 10 minutos cada uno). Para los lavados de las membranas se utilizó Buffer de Lavado (TBS 1X con 500µL de Tween-20 (TBST)). Se incubó agitando en overnight con el anticuerpo primario específico diluido en TBS, a 4°C. Se lavaron las membranas en 2 ocasiones por 10 minutos con Buffer de Lavado para incubar a temperatura ambiente y en agitación, con una dilución (1:10000) del anticuerpo secundario (horseradish peroxidase-conjugated) correspondiente en TBST por 2 horas. Cuando la incubación terminó, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a las membranas con TBST. Se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology) para la detección de bandas y se expuso en placas fotográficas (GE Healthcare). Con la ayuda de programas como DIGI-DOC y LabWorks se cuantificó la cantidad de proteína expuesta, contrastando con el basal

correspondiente (el cual representa el 100%). Las gráficas representan los resultados obtenidos en los ensayos.

### 2.5.5 Dilución de anticuerpos:

Los anticuerpos empleados en este estudio y sus diluciones correspondientes son los siguientes, disueltos en Buffer anti-fosfoproteínas. (Tris, NaCl) (TBS)

<b>Anticuerpos primarios</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>AKT/PKB (PH domain)</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>p-AKT 1/2/3 (Ser 473)</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>p-AKT 1/2/3 (Thr 308)</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>ERK ½</b>	anti-goat	1:10,000
<b>p-ERK (Tyr 204)</b>	anti-goat	1:10,000
<b>PIEK (p85 α)</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>p-PIEK (p85α) (Tyr 199)</b>	anti-goat	1:10,000
<b>JNK</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>p-JNK (Thr 183 Tyr 185)</b>	anti-rabbit	1:10,000
<b>β- Actina</b>	anti-mouse	1:10,000

<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución</b>
<b>HRP</b>	
<b>Anti-rabbit</b>	1:10,000
<b>Anti-goat</b>	1:10,000
<b>Anti-mouse</b>	1:10,000

### 2.5.6 Ensayo de migración celular cicatriz-herida.

Se realizó el ensayo cicatriz-herida (wound-healing) para valorar la motilidad celular. Se crecieron las células FaDu a confluencia adecuada en cajas de 6 pozos con

medio DMEM+ SBF (10%) a 80-90% de confluencia. Consecuentemente, con una punta de 10  $\mu$ L estéril se realizó una incisión en forma de gato en el centro de la monocapa de células a lo largo de cada pozo evitando discordancias en el ancho de cada herida realizada al cultivo. Al realizar la incisión, los restos de células que se desprendieron fueron removidos con vacío y cada pozo fue lavado con PBS estéril dos veces. Para inhibir la proliferación, las células fueron incubadas durante 30 minutos con Ara C a una concentración de 10 $\mu$ M para después tratarlas con 50  $\mu$ M de nobiletina. A través del microscopio invertido pudimos observar el cierre de la herida. Se tomaron fotografías utilizando el objetivo 10X en diez campos distintos a diferentes tiempos: 0, 24 y 48 horas. Con el software ImageJ se logró medir el área libre de células para el adecuado cálculo que aportó el porcentaje de migración.

### **2.5.7 Ensayo de migración celular en cámara de Boyden.**

Se utilizaron 20,000 células FaDu contadas con la cámara de Neubauer en un medio DMEM sin SBF. Se colocaron las células en la parte superior de la cámara de Boyden cuyo fondo es una membrana con poros de 8  $\mu$ m, completando el volumen a 100  $\mu$ L de medio DMEM sin SBF. En la parte inferior de la cámara de Boyden se colocaron 300  $\mu$ L de medio DMEM con SBF al 10 % y con el tratamiento de 50 y 100  $\mu$ M de nobiletina. Enseguida se unieron las partes de la cámara de Boyden y se incubó por 2 h a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo se limpió la membrana de cada cámara de Boyden y se tomaron fotografías bajo el microscopio a 10 X de 10 campos diferentes. Usando el programa ImageJ se contaron las células atrapadas en la membrana.

### **2.5.8 Extracción de mRNA.**

En una caja de 6 pozos se cultivó la línea celular FaDu hasta una confluencia adecuada, después se trató la caja con el tratamiento de gradiente de concentración. Para aislar el ARN total se añadieron (sobre hielo) 500 $\mu$ L de trizol. Para después incubarlo por 5 minutos para alcanzar el rompimiento de las células. Posteriormente, se recuperó con una micropipeta y se adicionaron en tubos Eppendorf estériles. Se añadieron 100  $\mu$ L de cloroformo (1:50), se agitó y durante 5

minutos se incubaron a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron (15 min; 12,000 rpm, 4°C). La fase acuosa fue recuperada y añadida en otro tubo eppendorf estéril. Se añadieron 20 µL de isopropanol para incubarse a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente durante 10 minutos a 12,000 rpm y a una temperatura de 4°C se centrifugó la muestra para que los ácidos nucleicos se precipitaran. El sobrenadante fue decantado y se dejó secando logrando la evaporación, hasta que la pastilla eliminara la humedad. Con 20 µL de agua tratada con dietilpírocabonato (DEPC 1%) se resuspendió el RNA obtenido y se cuantificó a 260 nm por medio de espectrofotometría.

#### **2.5.9 Reacción en cadena de la polimerasa- transcripción reversa RT-PCR.**

Se utilizó 1 µg de RNA previamente obtenido se transcribió de forma reversa (a cDNA) usando un reactivo de Invitrogen: One-step RT-PCR. Los primers utilizados para llevar a cabo las amplificaciones de PCR fueron los siguientes: PTEN (sentido) 5'-TTT CTA ACC GTG CAG CCT CTT-3'; PTEN-(antisentido):5'-AGC TGT GGT GGG TTA TGG TCT-3' fue usado para amplificar un producto de 162 bp. GADPH: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAAAA-3'(sentido) y 5'-ACGCCTGCTTCACCACCTT-3' (antisentido). Estos primers fueron diseñados a partir de secuencias publicadas en la base GenBank y posteriormente se obtuvo la secuencia de los mismos utilizando el programa Primer-Blast (NCBI) con la finalidad de mandarlos sintetizar a Biosearchtech (Petaluma, CA). Las condiciones utilizadas en este proceso fueron las siguientes: 1 ciclo de 60 °C por 15 min y 94 °C por dos minutos seguido se 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C o 60°C por 1 min, 72°C por 1 min seguido de 10 min at 72°C. Los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro etidio.

#### **2.5.10 Ensayo de ELISA evaluando la producción de VEGF.**

Los niveles de VEGF en los sobrenadantes del cultivo celular fueron analizados por el VEGF (human) ELISA kit (ENZO-KIT156-0001, Enzo Life Sciences Farmingdale, NY). Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos e incubaron por 24h. Posteriormente, las células FaDu se trataron con nobiletina a una concentración de 100 µM en los tiempos 0,15, 30, 60, 90 y 120 minutos con medios DMEM y SBF al

2%. El sobrenadante se recolectó y almacenó en el Ultracongelador a  $-69^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de VEGF presente en las muestras se midió conforme a lo establecido en las instrucciones del fabricante y normalizada a números celulares para cada tratamiento. Se realizó un total de 3 experimentos independientes.

### **2.5.11 Ensayo de TUNEL**

Se colocaron las células sobre cubreobjetos ayudados de cajas de 6 pozos, se trataron por 24 h a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 300  $\mu\text{M}$  de nobiletina. Al término las muestras se procesaron según el TUNEL kit assay, Promega G7360. Posteriormente se tomaron fotografías en el microscopio a 40X y 100X. Utilizando el programa ImageJ se contaron los núcleos apoptóticos dividiendo entre el total de células en el campo, graficando los resultados. Cada condición fue repetida tres veces para el posterior análisis.

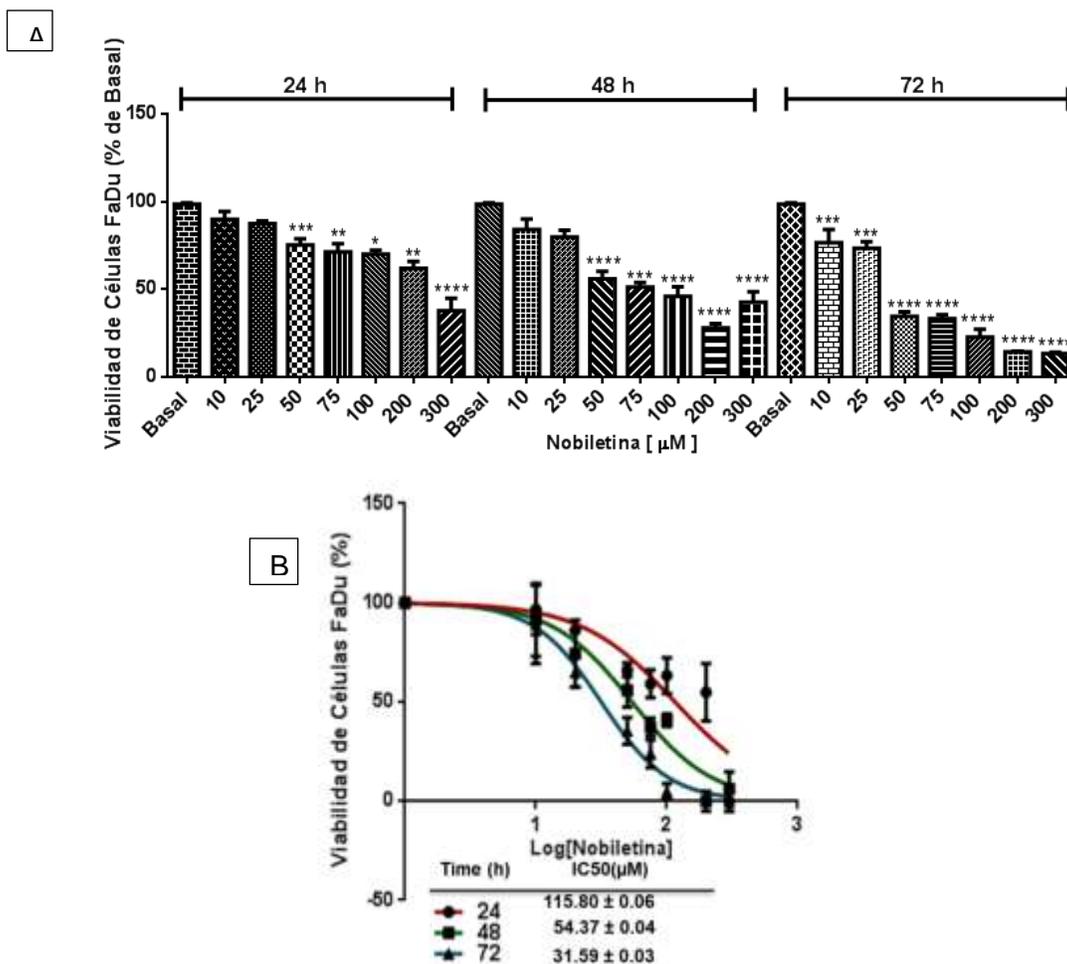
### **2.5.12 Análisis estadístico.**

En el caso del ensayo de viabilidad celular, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $P < 0.05$ ) con el fin de comparar únicamente la viabilidad celular de las cinco concentraciones distintas (5 grupos). Este procedimiento se realizó en cada tiempo (24,48 y 72h) utilizando una comparación múltiple de Dunnet utilizando el programa GraphPad Prism. Para el Western Blot, se utilizó también una ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ) para hacer el análisis estadístico de los duplicados de cada proteína analizada. En el caso del ensayo de Wound healing el análisis fue diferente; se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, ya que el propósito era comparar las diferencias entre los dos grupos (control y tratamiento) en diferentes tiempos. El ensayo se realizó por triplicado utilizando la prueba post-hoc bonferroni en el programa GraphPad Prism.

## **2.6 Resultados**

### **2.6.1 Efecto de nobiletina sobre la viabilidad de la línea celular FaDu**

Para determinar el efecto citotóxico de la nobiletina sobre la línea celular FaDu, se realizó el ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a 0,10, 25, 50,75,100, 200 y 300  $\mu\text{M}$  del flavonoide a 24, 48 y 72 h. De acuerdo con la figura 25 A, la nobiletina disminuyó la viabilidad celular a una dosis-dependiente; significativamente a partir de 50  $\mu\text{M}$  a 24 h y 48 h respecto a el grupo control. También mostró disminución a 72 h desde la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Por otra parte, se obtuvo la gráfica para determinar la concentración inhibitoria 50 a 24 h (115.80  $\mu\text{M}$ ), 48 h (54.37  $\mu\text{M}$ ) y 72 h (31.59  $\mu\text{M}$ ) (Fig.25 B).



**Fig. 25 Efecto de Nobiletina sobre la viabilidad de la línea celular FaDu. A Gráfica de viabilidad de la línea celular FaDu en presencia de nobiletina a diferentes concentraciones a 24 h, 48 y 72h. B Determinación de la concentración inhibitoria 50. Los resultados representan 3 experimentos (cada uno por sextuplicado) independientes. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$**

### 2.6.2 Efecto de nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu.

Para evaluar el efecto de la nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu, se realizó el ensayo de cicatriz-herida; las células crecieron en cajas de 6 pozos y fueron tratados con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  a 24 h y 48 h. Se tomaron fotografías de las heridas desde el tiempo 0 al 24 h y 48 h. De acuerdo con la figura 26, el tratamiento con nobiletina presentó un efecto inhibitorio de la migración celular en comparación con el grupo basal.

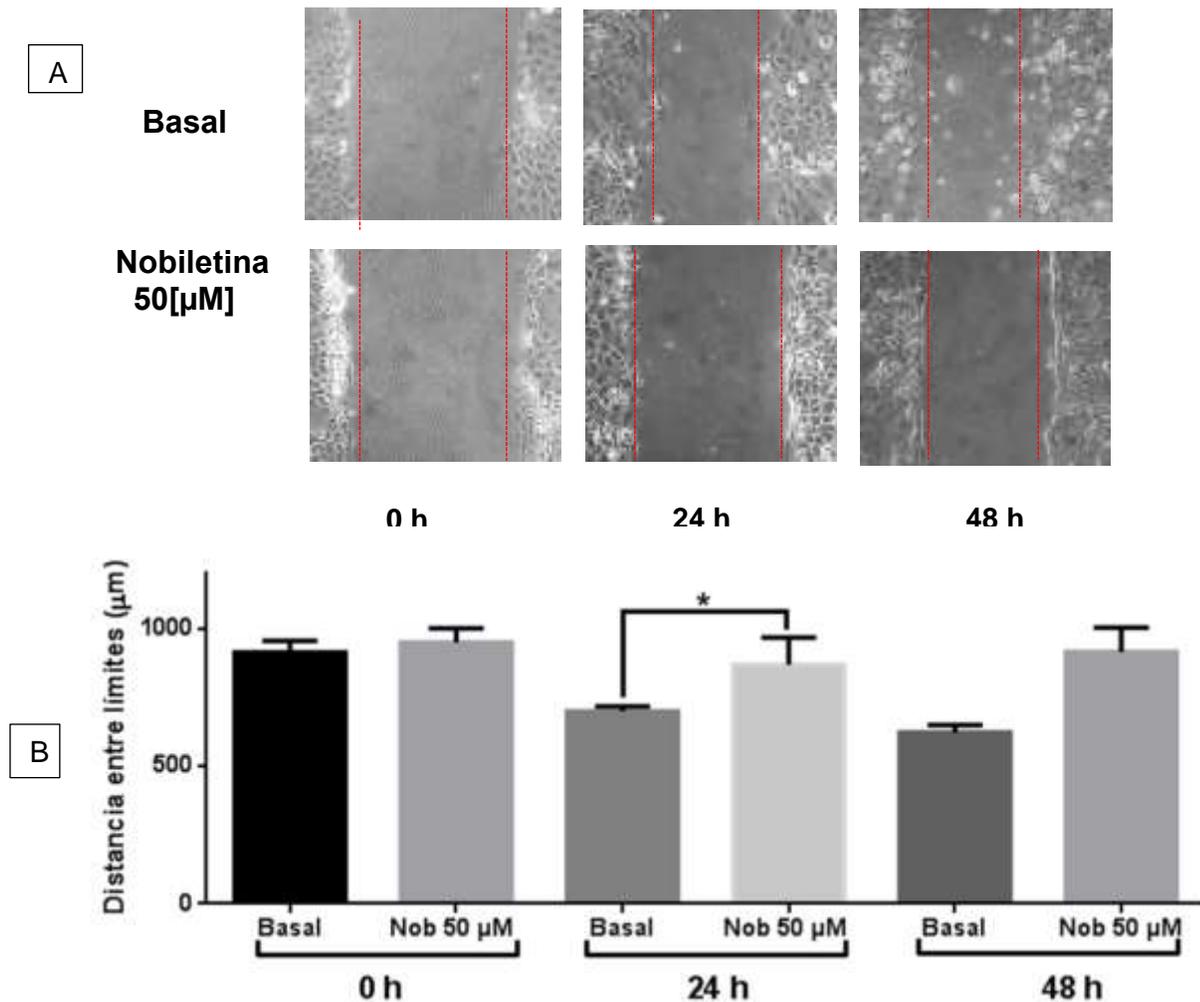
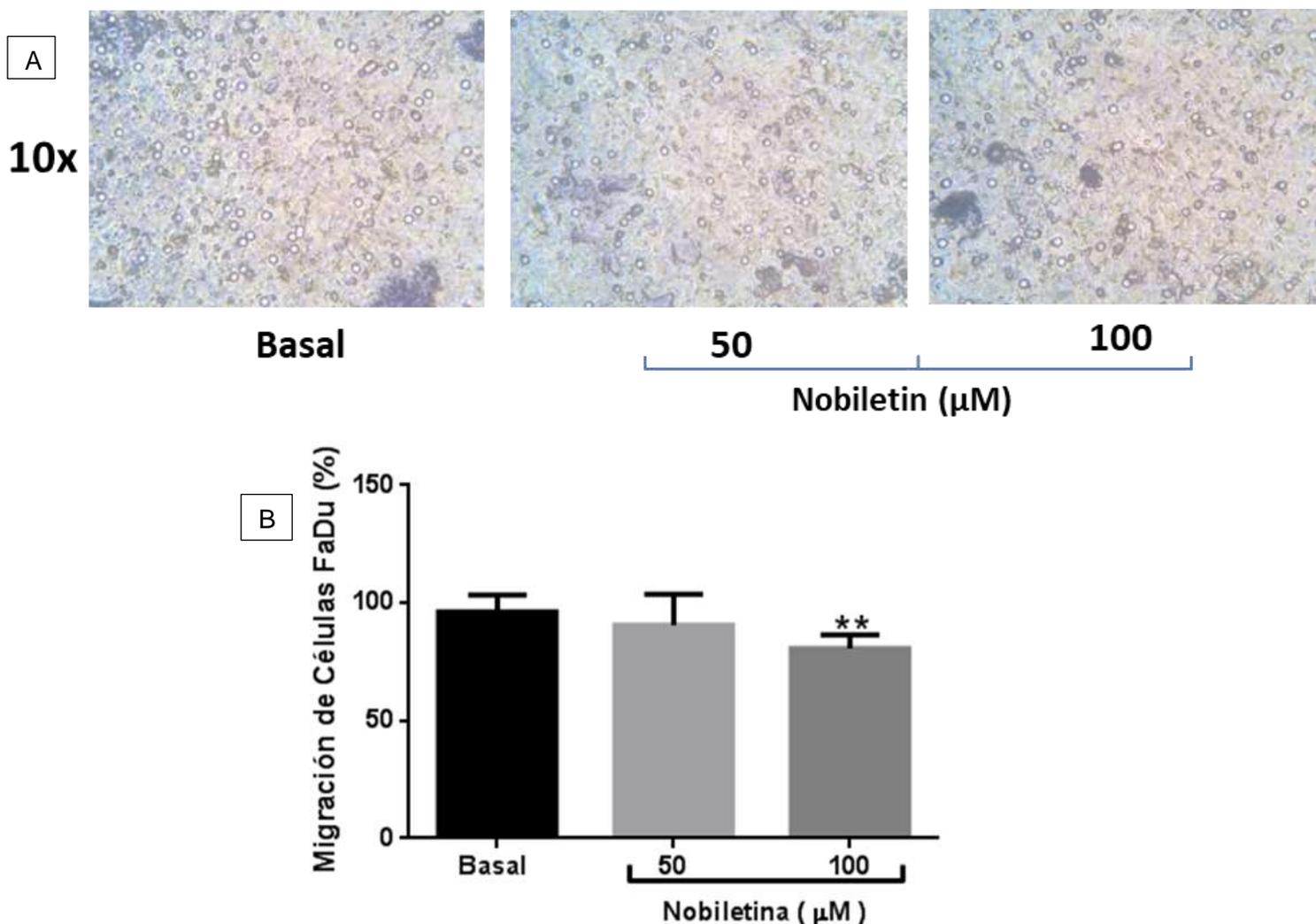


Fig. 26 Efecto de la nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu. A Límites de la cicatriz herida transcurrida 2 h de tratamiento con nobiletina 50  $\mu\text{M}$ . B Gráfica de la distancia de los límites en la cicatriz-herida con diferencia significativa. \* $p < 0.05$

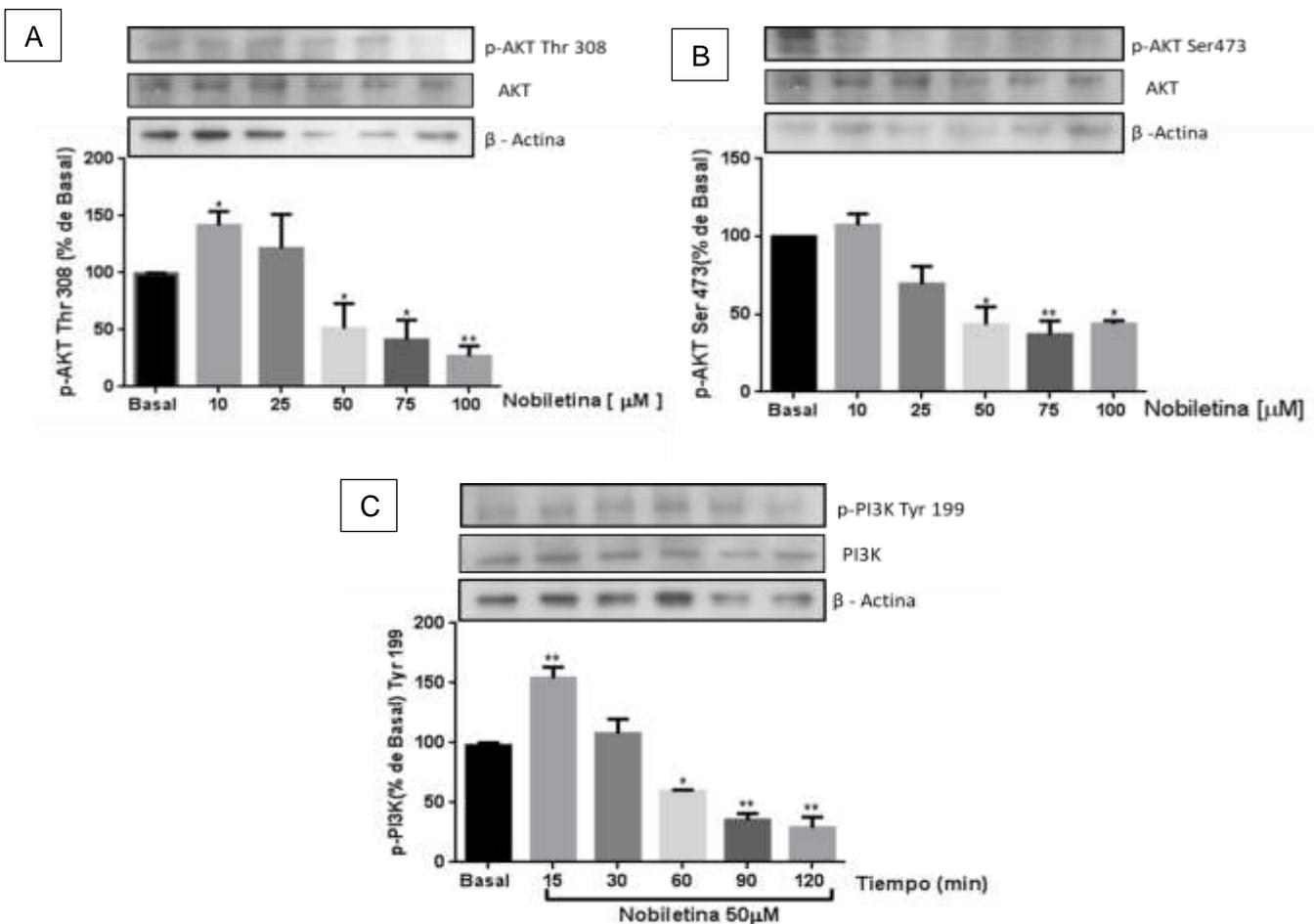
Posteriormente se realizó el ensayo de migración celular con la cámara de Boyden, para evaluar el efecto de la nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu. De acuerdo con la figura 27, el flavonoide presentó un efecto inhibitorio de la migración celular a 50 y 100  $\mu\text{M}$  a 2 h, teniendo significancia estadística en la última concentración en comparación con el grupo basal.



**Fig. 27 Efecto de la nobiletina sobre la migración de la línea celular FaDu. A Membranas de la cámara de Boyden con células FaDu bajo en tratamiento de nobiletina a 50 y 100  $\mu\text{M}$  durante 2 h. B Gráfica de la distancia entre los límites de la cicatriz-herida con diferencia significativa. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .**

### 2.6.3 Efecto de nobiletina sobre la fosforilación de Akt/ PI3K en la línea celular FaDu.

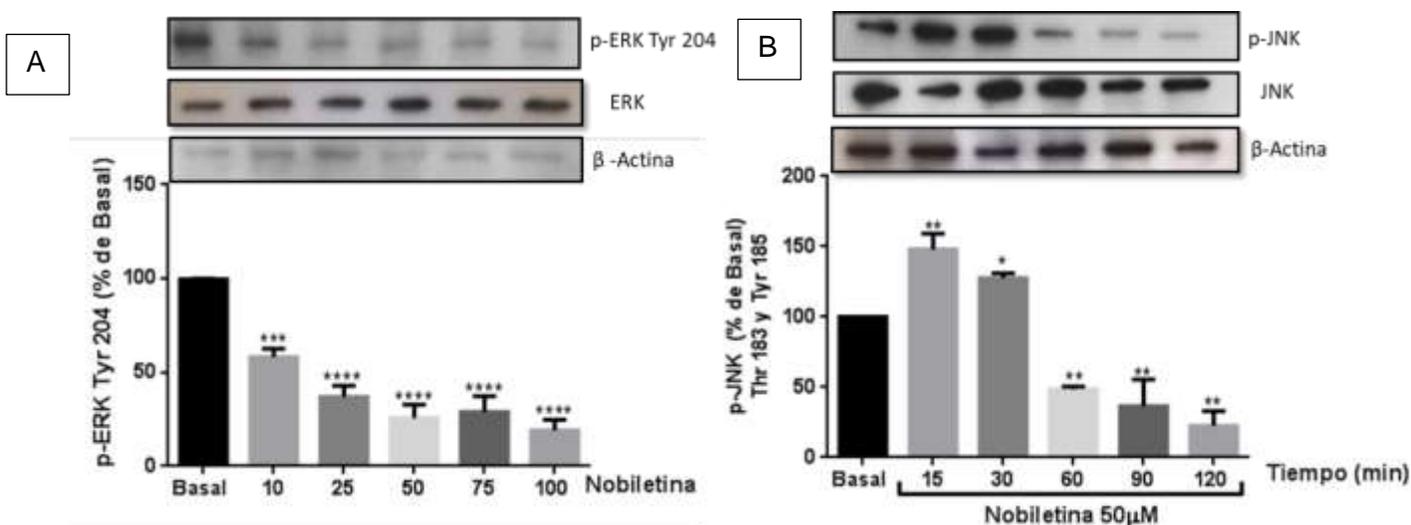
Se determinó el efecto anticancerígeno de la nobiletina en la fosforilación de p-AKT (Ser 473 y Thr 308) a diferentes concentraciones por 24 h (Fig. 28 A y B) y a una sola concentración en diferentes tiempos en PI3K (Fig. 28 C). La figura 28 muestra las gráficas obtenidas de los Western Blots, a partir de 50  $\mu$ M disminuye significativamente la fosforilación de AKT. Aunado a esto, la nobiletina presentó disminución significativa sobre PI3K de 60 a 120 min todos por debajo de la mitad del control.



**Fig. 28 Efecto de la nobiletina sobre fosforilación de Akt/PI3K en la línea celular FaDu. Ensayo de Western Blot a 0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ M de nobiletina a 24 h para AKT y para PI3K a una concentración de 50  $\mu$ M a diferentes tiempos con sus respectivas gráficas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .**

### 2.6.4 Efecto de la nobiletina sobre la fosforilación de ERK y JNK en la línea celular FaDu.

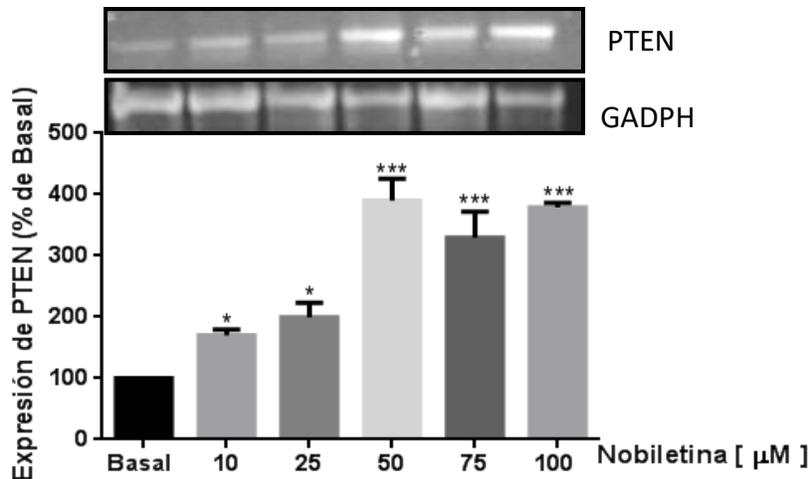
Se determinó el efecto anticancerígeno de la nobiletina sobre la línea celular FaDu en la fosforilación de p-ERK (Fig. 29 A) a diferentes concentraciones y p-JNK (Fig. 29 B) a diferentes tiempos. P-ERK a partir de 10 hasta 1000  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente debajo de la mitad respecto al control. El flavonoide, a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  disminuyó la fosforilación de p-JNK a partir de 60 min hasta 120 min por debajo de la mitad respecto al control.



**Fig. 29** Efecto de la nobiletina sobre la fosforilación de ERK y JNK en la línea celular FaDu. Ensayo de Western Blot a 0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  de nobiletina para ERK a 24 h (A) y para JNK a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  a diferentes tiempos (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 2.6.5 Efecto de nobiletina sobre la expresión de PTEN en la línea celular FaDu.

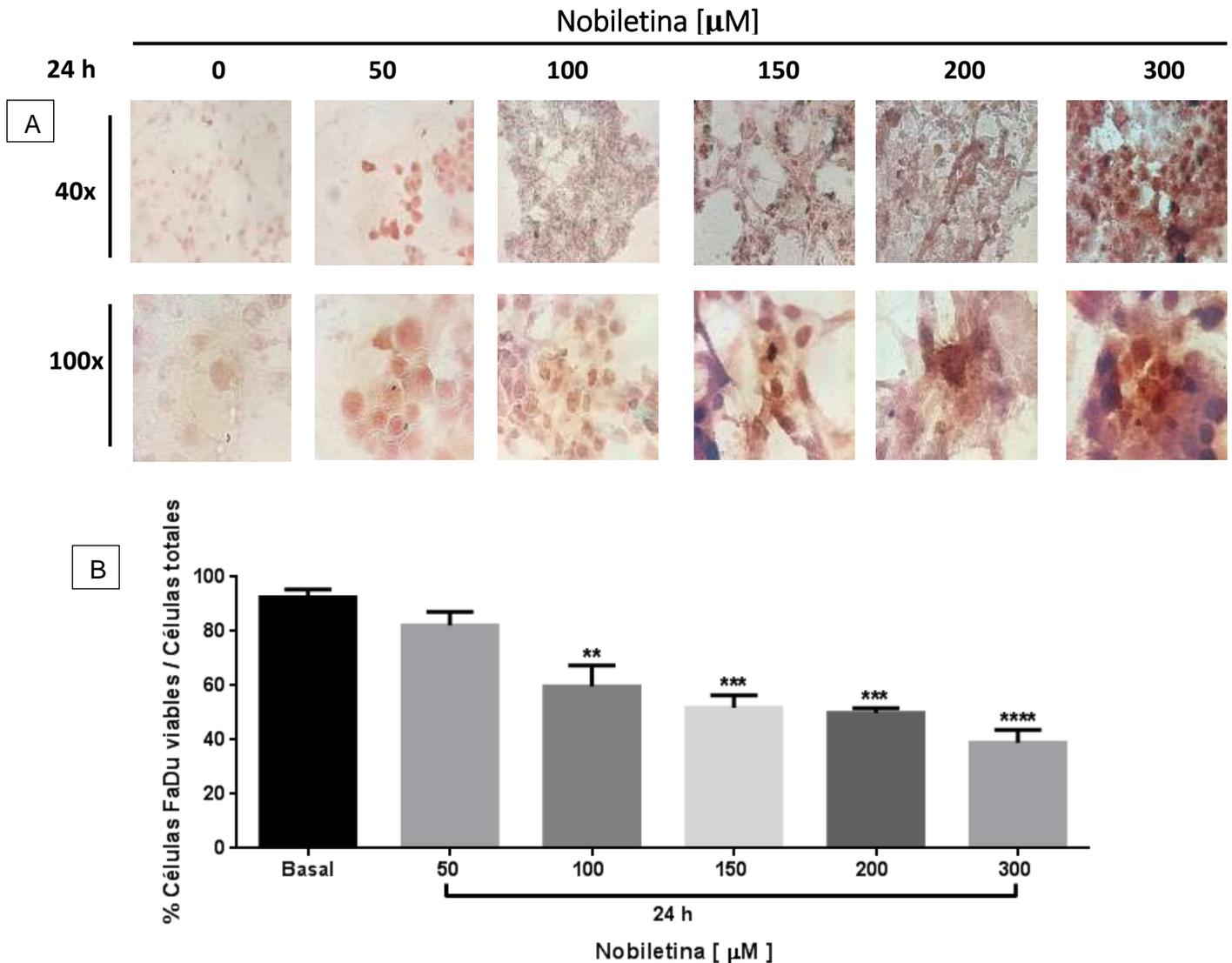
Se determinó el efecto de la nobiletina a una concentración de 0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  a 24 h. La figura 30 muestra que a todas las concentraciones, la nobiletina indujo la expresión de PTEN y se alcanzó un máximo de inducción a partir de 50  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 30 Efecto de la nobiletina sobre la expresión de PTEN en la línea celular FaDu. Ensayo de RT-PCR a 0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{M}$  de nobiletina. durante 24 h. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .**

### 2.6.6 Efecto de la nobiletina sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular FaDu.

Para evaluar el efecto de la nobiletina sobre la línea celular FaDu en la formación de cuerpos apoptóticos, se realizó el ensayo de TUNEL (medición de la fragmentación del DNA nuclear) a diferentes concentraciones por 24 h. De acuerdo con la figura 31 A, se observa que a partir de una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de Nobiletina se registra la presencia de cuerpos apoptóticos, y a 100  $\mu\text{M}$  aumenta la formación de éstos. La gráfica de la figura 31 B muestra que entre mayor concentración menor número de células viables, desde la concentración de 50  $\mu\text{M}$  disminuyen.

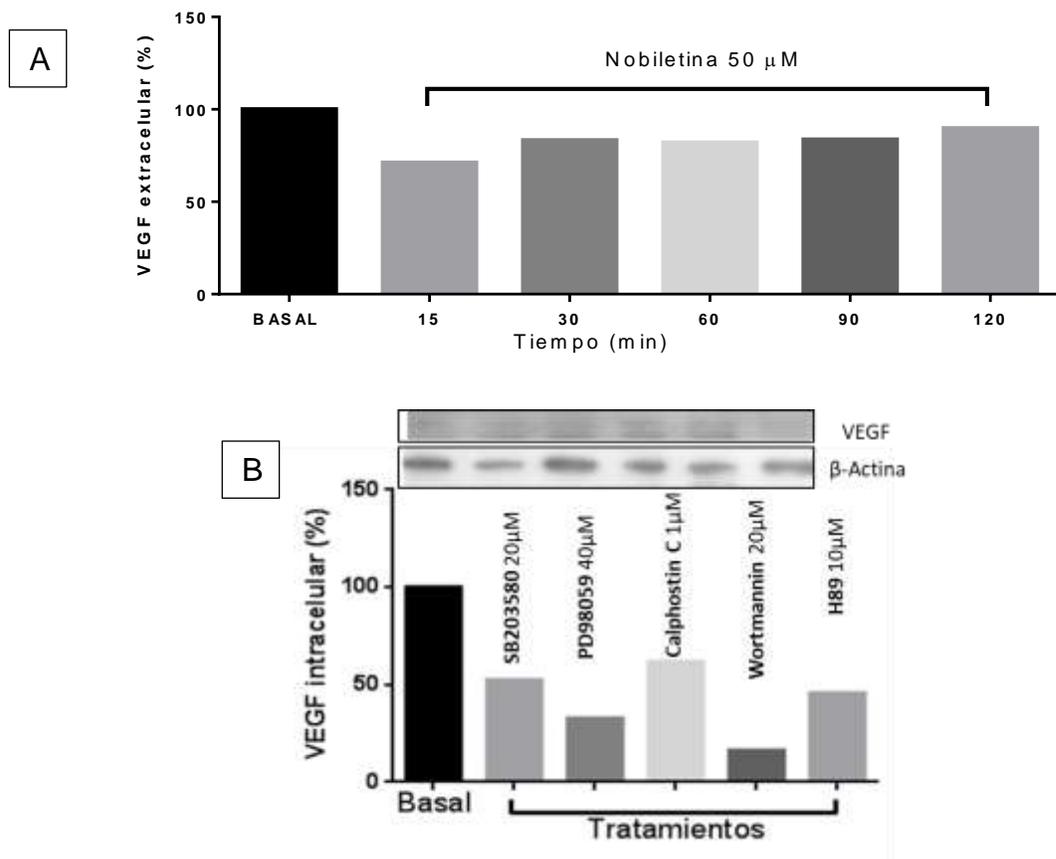


**Fig. 31 Efecto de Nobiletina sobre la formación de cuerpos apoptóticos en la línea celular FaDu. (A) Células FaDu con cuerpos apoptóticos a 40X y 100X tratadas con 0, 50, 100, 150, 200 y 300  $\mu\text{M}$  de nobiletina por 24 h. (B) Gráfica de células viables con núcleos apoptóticos dentro sobre células totales en el campo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .**

### 2.6.7 Efecto de nobiletina en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por la línea celular FaDu.

Se determinó el efecto de nobiletina sobre la línea celular FaDu en la expresión de VEGF a 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min a 50  $\mu\text{M}$ . La figura 32 A muestra que disminuyó

la producción de VEGF a desde el menor tiempo usado, pero vuelve a ascender conforme aumenta el tiempo. Posteriormente, se trataron las células con diferentes inhibidores (Fig. 32 B) demostrando que todos los inhibidores intervienen en la producción de VEGF, y Wortmannin inhibidor de la proteína PI3K mostró ser clave en la producción de este factor, al disminuir sus niveles por debajo de la mitad respecto al control.



**Fig. 32 Efecto de la nobiletina en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) sobre la línea celular FaDu. (A) Ensayo de ELISA a los medios recuperados del tratamiento con 50 μM de nobiletina a diferentes tiempos. (B) Ensayo de Western Blot para detectar la presencia de VEGF dentro de las células bajo el tratamiento con inhibidores.**

## 2.7 Discusión

Mediante el ensayo de viabilidad se comprobó que la nobiletina tiene efecto citotóxico en la línea celular FaDu dependiente de la dosis, particularmente se observó diferencia significativa desde la concentración de 50  $\mu\text{M}$  a 24 h lo cual nos dio pauta para establecer la concentración de los tratamientos con cursos temporales a una sola concentración. Se observó que la IC 50 disminuyó conforme aumenta el tiempo de exposición lo cual indica que no solo depende de la concentración sino también del tiempo de exposición. Las concentraciones inhibitorias 50 a 24, 48 y 72 h fueron de 115.8, 54.57 y 31.59  $\mu\text{M}$ , respectivamente utilizando los datos del ensayo de viabilidad con MTT. No se ha reportado en la literatura la determinación de la IC50 con nobiletina y la línea celular FaDu pero sí se encontró que en líneas celulares de tiroides normales de rata la IC50 a 72 h fue de 121.6  $\mu\text{M}$  en líneas celulares de cáncer de tiroides la IC50 fue muy similar de 118.9 a 145.1  $\mu\text{M}$  de nobiletina a 72 h [156]. En otros estudios se reportó que la nobiletina en presencia del citocromo CYP1 la IC50 es de 30  $\mu\text{M}$  a 24 h en cáncer de mama [157]. Observando estos resultados se puede asumir que la nobiletina puede actuar en células humanas y no humanas, en un intervalo de 30 a 145  $\mu\text{M}$ . Es difícil llegar a un consenso con otros laboratorios para establecer las mismas condiciones para este análisis, pero el aproximado es certero.

La migración de las células cancerígenas es uno de los problemas que deriva en metástasis, utilizando dos ensayos, evaluando la migración de la línea celular FaDu se observa en la figura 26 la inhibición de la migración celular con 50  $\mu\text{M}$  de nobiletina a 24 y 48 horas, con diferencia significativa en el primero. También apreciamos que en la figura 27 la migración a través de la membrana fue inhibida significativamente con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a 2 horas.

La proteína AKT una vez fosforilada en los sitios Thr 308 y Ser 473, tiene efectos promotores de la proliferación. Usando ensayos de Western Blot se observó que la disminución de la fosforilación de la proteína AKT. En la figura 28 se muestra una inhibición de la fosforilación de ambos sitios de AKT, dependiente de la concentración de nobiletina. También se muestra que la proteína PI3K, la cual da paso a la activación de AKT, disminuye la fosforilación dependiente del tiempo a la

concentración de 50  $\mu\text{M}$ , en Tyr 199 el cual es un sitio específico de la subunidad reguladora p55 y [158]. Esto sugiere que la nobiletina está interactuando con las proteínas AKT y PI3K evitando así su fosforilación, aunque también puede indicar que actúa río arriba a nivel del receptor o los sustratos primarios. El mecanismo de inhibición permanece sin conocerse en la literatura, mi supuesto es que podría interactuar directamente en los sitios de fosforilación de las proteínas o en un sitio alostérico provocando un cambio conformacional. Otro mecanismo alternativo puede ser de manera indirecta interactuar con el producto o sustrato de PI3K, interactuando con  $\text{PIP}_3$  o  $\text{PIP}_2$ . La interacción con  $\text{PIP}_3$  puede evitar que AKT sea reclutada a la membrana y puede promover que PI3K se inhiba al haber mayor concentración del producto.

La nobiletina muestra actividad en ambas proteínas PI3K y AKT, sugiriendo que su estructura logra interactuar con la estructura de la proteína. En la actualidad existen diferentes técnicas para conocer más sobre la interacción molécula proteína. Como ejemplo existen ensayos *in silico* [159] que a partir de programas de computadora y la estructura tridimensional de la proteína y la molécula da posibles puntos donde la molécula puede estar interactuando con la proteína. También existen ensayos con inhibidores específicos [65, 160] los cuales podrían sugerir interacciones si se prueba a la par con nobiletina. Y si no es suficiente, existe el docking molecular que es una técnica mediante la cual se analiza qué grupos de la molécula pueden estar interaccionando con la proteína y propone más de una estructura similar las cuales puede tener una actividad más específica aún. Así la nueva molécula podría sintetizarse y probar su actividad *in vitro*.

Se sabe que la interacción de un receptor con un factor de crecimiento puede promover más que la activación de PI3K y AKT, por este motivo se evaluaron las cinasa ERK y JNK las cuales se activan ante estímulos externos. JNK es una cinasa que promueve la respuesta inflamatoria y también promueve la apoptosis, más específicamente se ha observado que existen linajes celulares como linfocitos donde JNK es crucial para la proliferación. ERK es otra cinasa que está involucrada en el crecimiento y diferenciación celular. Ambas cinasas pueden ser activadas ante diversos estímulos, no solo factores de crecimiento. En la figura 29 se observa que

la fosforilación de ERK en Tyr 204 disminuyó bajo la presencia de nobiletina de manera dependiente de la concentración. Para JNK en los sitios de Thr 183 y Tyr 185 se observa una disminución de la fosforilación de manera dependiente del tiempo a una concentración de 50  $\mu$ M de nobiletina. Estos resultados sugieren que el estímulo externo no está siendo propagado cascada abajo o que la nobiletina está interactuando directamente con estas proteínas, esto puede deberse a más de un factor. El receptor puede estar interactuando con nobiletina, las proteínas Ras coadyuvantes de la activación de ERK y JNK, pueden ser secuestradas por nobiletina, o la cinasa MAP que está un paso arriba de ERK y JNK, puede ser inhibida por nobiletina. Para clarificar el mecanismo de acción de nobiletina se sugiere: utilizar inhibidores de MAP, bloqueadores de los receptores promotores de la activación de ERK y JNK, e inhibidores de AKT y PI3K para observar entrecruzamiento en las vías. Notablemente la nobiletina tuvo resultados en un ensayo de 24 h en ERK con las repeticiones necesarias para ser analizados sugiriendo una disminución en el estímulo de proliferación y diferenciación y resultados en JNK a 2 h con las repeticiones necesarias para ser analizados, también sugiriendo una disminución en el estímulo inflamatorio y apoptótico.

Evaluando las capacidades de la nobiletina en diferentes ámbitos se realizó un ensayo de RT-PCR para mostrar si el flavonoide ejercía algún efecto en los niveles de expresión del gen de PTEN, la figura 30 muestra que a mayor concentración de nobiletina el gen se expresaba más. Esto sugiere que la demanda por desforforilar PIP<sub>3</sub> se aumenta y para esto el gen es expresado más veces. La nobiletina puede estar interactuando con PIP<sub>3</sub> haciendo que el estímulo no se disperse cascada abajo, pero activando la necesidad de regularlo, y la mejor manera puede ser aumentando la expresión de la fosfatasa PTEN.

También, la nobiletina puede estar interactuando con factores de transcripción promoviendo transcripción de PTEN o está haciéndolo indirectamente interactuando un paso antes de la promoción del factor de transcripción para PTEN.

Los cuerpos apoptóticos son el resultado de cortar y condensar material genético en el interior de la célula sinónimos de la muerte celular, la figura 31 muestra que la cantidad de células con cuerpos apoptóticos inducidos aumenta conforme aumenta

la concentración de nobiletina. Lo cual puede sugerir que la nobiletina promueve el corte del material genético, estimulando la actividad de las caspasas.

Por último, se evaluó el efecto de la nobiletina en la producción del factor crecimiento vascular endotelial, el cual como su nombre lo indica promueve la formación de vasos sanguíneos que en el caso de cáncer puede promover el crecimiento de tumores. En la figura 32 se muestra los resultados de ELISA (A) y Western Blot (B) para determinar la cantidad de VEGF presente. Se observa que la cantidad de VEGF disminuyó solo en los primeros tiempos de tratamiento con nobiletina a 50 $\mu$ M para después estabilizarse al nivel basal. También se utilizaron los inhibidores: SB203580 que inhibe a la MAPK p-38 , PD98059 que inhibe a las MAPK MEK1 y MEK2 , Calphostin C que inhibe a la Proteína Cinasa C (PKC) , Wortmannin que inhibe a PI3K y H89 que inhibe a la Proteína Cinasa A (PKA). Se evaluó qué vía ejerce mayor efecto y se observó que la vía de PI3K fue la principal responsable en la producción del factor de crecimiento, se sugiere evaluar el efecto de los inhibidores a la par de nobiletina.

## **2.8 Conclusiones**

Como se observó en el presente trabajo la molécula de nobiletina pudo llegar al interior de las células cancerígenas y disminuyó su supervivencia.

Se determinó la IC50 a diferentes tiempos (24 h, 48 h y 72 h que fueron 115.80  $\mu$ M, 54.37  $\mu$ M y 31.59  $\mu$ M respectivamente). Los resultados señalan que la nobiletina en intervalo de 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M y un tiempo de 2 a 24 horas logra alterar la señalización interna de la línea celular FaDu. Confirmando que la nobiletina puede interactuar con las enzimas PI3K, AKT, ERK y JNK o con enzimas o sustratos cascada arriba. En todos los ensayos donde participaron estas cinasas disminuyeron su forma fosforilada por ende disminuye su actividad, evitando así que se propague el estímulo de proliferación.

Confirmamos que la nobiletina inhibe la migración de estas células y puede que la nobiletina esté actuando como agente apoptótico al generar cuerpos apoptóticos dependiendo de la concentración del flavonoide. Se sugiere reevaluar los ensayos para confirmar disminución en la producción de VEGF ya que la metodología usada

es muy costosa, no se contó con los estudios necesarios para análisis estadístico, pero se presume que la vía de PI3K es clave en la angiogénesis.

Se piensa que la nobiletina aumentó la transcripción de PTEN la fosfatasa que regula la cantidad de PIP<sub>3</sub> disminuyendo el reclutamiento de proteínas con dominio PH como AKT.

Por último, elucidar el mecanismo de acción de la nobiletina es uno de los próximos retos, se sugiere que la estructura de nobiletina sea modificada ya que no presenta selectividad. Esperando así que aumente su afinidad con alguno de los blancos en este trabajo.

## **2.9 Expectativas a futuro.**

Las propiedades que se ha demostrado hacen de nobiletina una molécula base para sugerir cambios estructurales vía docking, enfocándose en uno de los tantos blancos moleculares presentes en este trabajo. Puesto que nobiletina no tiene un blanco específico de acción hace que no sea un prospecto como fármaco contra el cáncer. Pero resulta interesante conocer como una estructura hexametilada de un flavonoide puede cambiar la señalización de células cancerígenas. Ya en el presente se cuenta con estudios de la viabilidad en células no cancerígenas bajo el efecto de nobiletina en el laboratorio donde se realizó el trabajo, demostrando que no destruye significativamente células sanas. Pero su efecto de desregulador de vías de señalización en células sanas no está reportado, me resulta de interés contrastar esos resultados.

Es un hecho que los compuestos con la estructura base de flavonoide tiene actividad en células cancerígenas. Existen miles de artículos recalando que nobiletina y otros flavonoides alteran la actividad de cinasas de importancia para el desarrollo del cáncer, pero todas estas moléculas no tienen selectividad y más aún, en mi parecer, no existe sustento suficiente de que los flavonoides no causan ninguna alteración en células sanas, ya que casi ninguno de los estudios realizado en células cancerígenas cita un trabajo realizado en tejido sano usando líneas celulares similares; sin embargo pienso que es real, que células sanas no se vean afectadas. Al no tener selectividad estos compuestos actúan indiscriminadamente en las células, encontrar un blanco específico y realizar modificaciones a la

estructura base para evaluar el efecto *in vitro* en un inicio resulta una necesidad si se desea que estos compuestos evolucionen de lo *in vitro* a lo *in vivo* y después a estudios clínicos. Porque sería alarmante que todo este trabajo quedase en resultados positivos solo en estudios *in vitro*. Sin embargo, se han reportado resultados de modelos *in vivo* con nobiletina y otros flavonoides, estudios como: trasplante de células cancerígenas a un organismo vivo, o generar cáncer con un compuesto y evaluar la respuesta ante el tratamiento con flavonoides en organismos vivos.

Más específicamente sugiero evaluar el efecto de nobiletina y sus metabolitos activos en un ensayo clonogénico, en la señalización de la apoptosis, evaluando PARP, la procaspasa 3, BAD, BAX y BID usando Western Blot y usar el ensayo de detección de la fosfatidilserina con Annexin V y FITC.

Existen miles de modificaciones que se pueden hacer a la molécula, desde los metabolitos activos que genera el citocromo CYP450 y CYP1 hasta las modificaciones que las herramientas como el DockK-in puede sugerir.

Las cinasas que promueven la proliferación de células cancerígenas son un blanco clave para combatir el cáncer, evaluar la actividad de la cinasa AKT o PKB con todas las sustancias posibles y diferentes técnicas es de ayuda para descartar compuestos sin actividad. Existen más de una vía de proliferación del cáncer como la vía Wnt que no ha tenido tanta difusión como AKT pero, evaluar más de una vía de proliferación en células cancerígenas y no cancerígenas sé que dará resultados para mejorar los tratamientos contra el cáncer.

## REFERENCIAS

- 1.- ASCO. Timeline 2019 [Disponible en: <https://www.asco.org/research-progress/cancer-progress-timeline>]
- 2.- NIH. Chronology events [Disponible en: <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/chronology-events>]
- 3.- WHO. GLOBOCAN. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
- 4.- Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E y Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.
- 5.- Hashibe M y Sturgis E. Epidemiology of oral-cavity and oropharyngeal carcinomas: controlling a tobacco epidemic while a human papillomavirus epidemic emerges. *Otolaryngol Clin North Am* 2013;46:541-50.
- 6.- Hashibe M, Brennan P, Chuang S, Boccia S, Castellsague X y Chen Cea. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:541–50.
- 7.- Blot W, McLaughlin J, Winn D, Austin D, Greenberg R y Preston-Martin Sea. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48:3282–7.
- 8.- Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W y Pohlabein Hea. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011;47:725-31.
- 9.- Dasanayake A, Silverman A y Warnakulasuriya S. Maté drinking and oral and oro-pharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2010;46:82-6.
- 10.- Meyer M, Joshipura K, Giovannucci E y Michaud D. A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer. *Cancer Causes Control* 2008;19:895–907.
- 11.- WHO I. Cancer Mortality Database [Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>]

- 12.- Shield K, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi A, Bray F, y col. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):51-64.
- 13.- Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J y Jemal A. Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
- 14.- ASCO. Laryngeal and Hypopharyngeal Cancer 2019 [Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/medical-illustrations>
- 15.- ASCO. Risk Factors 2019 [Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/risk-factors-and-prevention>
- 16.- ASCO. Symptoms and Signs 2019 [Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/symptoms-and-signs>
- 17.- Chaturvedi A, Anderson W, Lortet-Tieulent J, Curado M, Ferlay J, Franceschi S, y col. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013;31(36):4550-9.
- 18.- ASCO. Types of Treatment 2019 [Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/types-treatment>
- 19.- Seiwert T, Zuo Z, Keck M, Khattri A, Peadarallu C, Stricker T, y col. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2015;21(3):632-41.
- 20.- Hedberg M, Goh G, Chiosea S, Bauman J, Freilino M, Zeng Y, y col. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2016;126(4):169-80.
- 21.- Stransky N, Egloff A, Tward A, Kostic A, Cibulskis K, Sivachenko A, y col. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science.* 2011;333(6046):1157-60.
- 22.- Poeta M, Manola J, Goldwasser M, Forastiere A, Benoit N, Califano J, y col. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357(25):2552-61.

- 23.- Lim A, Do H, Young R, Wong S, Angel C, Collins M, y col. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. *Int J Cancer*. 2014;135(4):887-95.
- 24.- Lui V, Hedberg M, Li H, Vangara B, Pendleton K, Zeng Y, y col. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov*. 2013;3(7):761-9.
- 25.- Huang K, Huang S, Chen I, Liao C, Wang H y Hsieh L. Methylation of rassf1a, rassf2a, and hin-1 is associated with poor outcome after radiotherapy, but not surgery, in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15:4174-80.
- 26.- Ang K, Berkey B, Tu X, Zhang H, Katz R, Hammond E, y col. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(24):7350-6.
- 27.- Young R, Rischin D, Fisher R, McArthur G, Fox S, Peters L, y col. Relationship between epidermal growth factor receptor status p16(INK4A), and outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011;20(6):1230-7.
- 28.- Songs M, Salmena L y Pandolfi P. The funtions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(5):283-96.
- 29.- Gasche J y Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol*. 2012;8(11):1407-25.
- 30.- Gao S, Elberg H, Krogdahl A, Liu C y Sorensen J. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(2):116-9.
- 31.- Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Shiiba M, y col. Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*. 2005;15(4):597-602.
- 32.- Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna M, Mariggio A, Salvatore G, y col. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;70:249-54.

- 33.- Chen Y, Hsue S y Lin L. Survivin expression is regulated by an epigenetic mechanism for dmba-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinomas. *Arch Oral Biol.* 2005;50:593-8.
- 34.- Hsue S, Wang W, Chen Y y Lin L. Expression of inhibitors of apoptosis family protein in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis is associated with mutant p53 accumulation and epigenetic changes. *Int J Exp Pathol.* 2008;89:309-20.
- 35.- Su P, Huang W, Wu H, Wu C, Liu T y Kao S. p16(INK4A) promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. *Oral Oncol.* 2010;46:734-9.
- 36.- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee M, y col. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5455-63.
- 37.- Chang H, Chow V, Lam K, Wei W y Yuen A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer.* 2002;94:386-92.
- 38.- Kordi-Tamandani D, Moazeni-Roodi A, Rigi-Ladiz M, Hashemi M, Birjandian E y Torkamanzehi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch Oral Biol.* 2010;55(10):809-14.
- 39.- Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K y Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2011;47(8):702-8.
- 40.- Huang S, Lee H, Mar K, Ji D, Huang M y Hsia K. Loss expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to betel quid chewing in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod.* 2010;109(6):883-9.
- 41.- Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, y col. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and mgtm genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132:735-43.

- 42.- Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, y col. Promotor hypermethylation of p14arf is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:614-22.
- 43.- Taioli E, Ragin C, Wang X, Chen J, Langevin S, Brown A, y col. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC Cancer*. 2009;9:354.
- 44.- Sailasree R, Abhilash A, Sathyan K, Nalinakumari K, Thomas S y Kannan S. Differential roles of p16ink4a and p14arf genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2008;17:414-20.
- 45.- Takeshima M, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, y col. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(8):475-9.
- 46.- Yeh K, Chang J, Lin T, Wang Y, Tien N, Chang J, y col. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, p15, p16, vhl and p53 in oral cancer. *Oncol Rep*. 2003;10:659-63.
- 47.- Kresty L, Mallery S, Knobloch T, Song H, Lloyd M, Casto B, y col. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res*. 2002;62(18):5292-300.
- 48.- Cao J, Zhou J, Gao Y, Gu L, Meng H, Liu H, y col. Methylation of p16 CpG island associated with malignant progression of oral epithelial dysplasia: a prospective cohort study. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5178-83.
- 49.- Ruesga M, Acha-Sagredo A, Rodríguez M, Aguirregaviria J, Videgain J, Rodríguez C, y col. p16(INK4a) promoter hypermethylation in oral scrapings of oral squamous cell carcinoma risk patients. *Cancer Lett*. 2007;250(1):140-5.
- 50.- Shaw R, Liloglou T, Rogers S, Brown J, Vaughan E, Lowe D, y col. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer*. 2006;94(4):561-8.
- 51.- Youssef E, Lotan D, Issa J, Wakasa K, Fan Y, Mao L, y col. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10:1733-42.

- 52.- Viet C y Schmidt B. Methylation array analysis of preoperative and postoperative saliva DNA in oral cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(12):3603-11.
- 53.- Concha-Benavente F, Srivastava R, Ferrone S y Ferris R. Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. *Oral Oncol.* 2016;58:52-8.
- 54.- Curry J, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, y col. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Semin Oncol.* 2014;41(2):217-34.
- 55.- Peltanova B, Raudenska M y Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer.* 2019;18:63.
- 56.- Neville B y Day T. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(4):195-215.
- 57.- Helliwell T. aCP Best Practice No 169. Evidence based pathology: squamous carcinoma of the hypopharynx. *J Clin Pathol* 2003;56(2):81-5.
- 58.- Lengyel E, Gilde K, Remenár E y Esik O. Malignant mucosal melanoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res.* 2003;9(1):7-12.
- 59.- Olsen K, Lewis J y Suman V. Spindle cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;116(1):47-52.
- 60.- Frank D, Cheron F y Cho Hea. Nonnasopharyngeal lymphoepitheliomas (undifferentiated carcinomas) of the upper aerodigestive tract. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:305-10.
- 61.- McKay M y Bilous A. Basaloid-squamous carcinoma of the hypopharynx. *Cancer.* 1989;63(12):2528-31.
- 62.- ASCO. Stages and Grades 2019 [Disponible en: <https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/stages-and-grades>
- 63.- Futreal P, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin C, Wooster R y Stratton M. Cancer and genomics. *Nature.* 2001;409:850-2.

- 64.- Wang Q, Cheaerkady R, Wu J, Hwang H, Papadopoulos N y Kopelovich L. Mutant proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2444-9.
- 65.- Duong-Ly K y Peterson J. The Human Kinome and Kinase Inhibition as a therapeutic strategy. *Curr Protoc Pharmacol* 2013;2.
- 66.- Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G y Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40:271-80.
- 67.- Raju T. The Nobel chronicles. 1992: Edmond H Fischer (b1920) and Edwin G Krebs (b 1918). *Lancet*. 2000;355:2004.
- 68.- Toledo F y Wahl G. Regulating the p53 pathway: In vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 2006;6:909-23.
- 69.- Floor S, Dumont J, Maenhaut C y Raspe E. Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med*. 2012;18(9):509-15.
- 70.- Sun J, Wei Q, Zhou Y, Wang J, Liu Q y Xu H. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC Syst Biol*. 2017;11:87.
- 71.- Fruman D, Chiu H, Hopkins B, Bagrodia S, Cantley L y Abrahamm R. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*. 2017;170(4):605-35.
- 72.- Vivanco I y Sawyers C. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
- 73.- Sun H, Lesche R, Li D, Liliental J, Zhang H, Gao J, y col. PTEN modulates cell cycle pregression and cel survival by regulating phosphatidylinositol 3, 4, 5,- trisphosphate and Akt/ protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11).
- 74.- Manning B y Toker A. AKT/PKB Singnaling: Navigating th Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405.
- 75.- Testa J y Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *PNAS*. 2001;98(20):10983-5.
- 76.- Wadhwa B, Makhdoomi U, Vishwakarma R y Malik F. Protein kinase B: emerging mechanisms of isoform-specific regulation of cellular signaling in cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 2017;28:569-80

- 77.- Cross D, Alessi D, Cohen P, Andjelkovich M y Hemmings B. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378:785-9.
- 78.- Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Jou P, Hu L, y col. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96:857-68.
- 79.- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J y Guan K. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and supresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4:638-57.
- 80.- Saxton R y Sabatini D. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168:960-76.
- 81.- Torkamani A, Verkhivker G y Schork N. Cancer driver mutations in protein kinase genes. *Cancer Lett*. 2009;281:117-27.
- 82.- Hanahan D y Weinberg R. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:645-74.
- 83.- Wermuth C. Multitargeted drugs: The end of the “one-target-one-disease” philosophy? *Drug DiscovToday*. 2004;9:826-7.
- 84.- Dias D, Urban S y Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2:303-36.
- 85.- Cragg G y Newman D. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005;200:72-9.
- 86.- Graziani Y, Erikson E y Erikson R. The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur J Biochem* 1983;135:583-9.
- 87.- Cochet C, Feige J, Pirollet F, Keramidas M y Chambaz E. Selective inhibition of a cyclic nucleotide independent protein kinase (G type casein kinase) by quercetin and related polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 1982;31:1357-61.
- 88.- Nakano H, Kobayashi E, Takahashi I, Tamaoki T, Kuzuu Y y Iba H. Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. *J Antibiot* 1987;40:706-8.

- 89.- Bhullar K, Lagarón N, McGowan E, Parmar I, Jha A, Hubbard B, y col. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*. 2018;17(1):48.
- 90.- Newman D. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? . *J Med Chem* 2008;51:2589–99.
- 91.- Xiao Z, Hao Y, Liu B y Qian L. Indirubin and Meisoindigo in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia in China. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(9):1763-8.
- 92.- Tong X y Pelling J. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Axis by Apigenin for Cancer Prevention. *Anti-Cancer Agents Med Chem*. 2013;13:971-8.
- 93.- Baier A, Nazaruk J, Galicka A y Szyszka R. Inhibitory influence of natural flavonoids on human protein kinase CK2 isoforms: effect of the regulatory subunit. *Mol Cell Biochem*. 2018;444(1):35-42.
- 94.- Panche A, Diwan A y Chandra R. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. 2016;5:e47.
- 95.- Shukla S, Bhaskaran N, Babcook M y Fu P. Apigenin Inhibits Prostate Cancer Progression in TRAMP Mice via Targeting PI3K/Akt/FoxO. *Carcinogenesis*. 2014;35(2):452-60.
- 96.- Shukla S, Kanwal R, Shankar E, Datt M, Chance M, Fu P, y col. Apigenin blocks IKK activation and suppresses prostate cancer progression. *Oncotarget* 2015;6:31216-32.
- 97.- NCBI. PubChem [Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>]
- 98.- Shao J, Wang C, Li L, Liang H, Dai J, Ling X, y col. Luteoloside Inhibits Proliferation and Promotes Intrinsic and Extrinsic Pathway-Mediated Apoptosis Involving MAPK and mTOR Signaling Pathways in Human Cervical Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19:1664.
- 99.- Liu H, Dong Y, Gao Y, Du Z, Wang Y, Cheng P, y col. The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer: A Review. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1681.
- 100.- Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J, Yin Y, Kim K, Kumar Saha S, y col. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int JMol Sci* 2016;17:569.

- 101.- Chin H, Horng C, Liu Y, Lu C, Su C, Chen P, y col. Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Oncol Rep.* 2018;39:2351–7.
- 102.- Kashafi E, Moradzadeh M, Mohamadkhani A y Erfanian S. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways. *Biomed Pharmacother* 2017;89:573–7.
- 103.- Hung T-W, Chen P-N, Wu H-C, Wu S-W, Tsai P-Y, Hsieh Y-S, y col. Kaempferol Inhibits the Invasion and Migration of Renal Cancer Cells through the Downregulation of AKT and FAK Pathways. *Int J Med Sci.* 2017;14:984–93.
- 104.- Sun X, Ma X, Li Q, Yang Y, Xu X, Sun J, y col. Anti-cancer effects of fisetin on mammary carcinoma cells via regulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway: In vitro and in vivo studies. *Int J Mol Med* 2018;42:811-20.
- 105.- Zhang X-J y Jia S-S. Fisetin inhibits laryngeal carcinoma through regulation of AKT/NF-kB/mTOR and ERK1/2 signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:1164–74.
- 106.- Kang K, Piao M, Madduma Hewage S, Ryu Y, Oh M, Kwon T, y col. Fisetin induces apoptosis and endoplasmic reticulum stress in human non-small cell lung cancer through inhibition of the MAPK signaling pathway. *Tumor Biol.* 2016;737:9615–24.
- 107.- Lim W, Park S, Bazer F y Song G. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *J Cell Biochem* 2017;118:1118–31.
- 108.- Bao L, Liu F, Guo H-B, Li Y, Tan B-B, Zhang W-X, y col. Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumor Biol.* 2016;37:11365–74.
- 109.- Zhang X, Liu J, Zhang P, Dai L, Wu Z, Wang L, y col. Silibinin induces G1 arrest, apoptosis and JNK/SAPK upregulation in SW1990 human pancreatic cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;15:9868–76.

- 110.- Mao J, Yang H, Cui T, Pan P, Kabir N, Chen D, y col. Combined treatment with sorafenib and silibinin synergistically targets both HCC cells and cancer stem cells by enhanced inhibition of the phosphorylation of STAT3/ERK/AKT. *Eur J Pharmacol.* 2018;832:39–49.
- 111.- Chen X, Gu N, Xue C y Li B. Plant flavonoid taxifolin inhibits the growth, migration and invasion of human osteosarcoma cells. . *Mol Med Rep* 2018;17:3239–45
- 112.- Oi N, Chen H, Kim M, Lubet R, Bode A y Dong Z. Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3-K. . *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(9):1103-14.
- 113.- Tanjak P, Thiantanawat A, Watcharasit P y Satayavivad J. Genistein reduces the activation of AKT and EGFR, and the production of IL6 in cholangiocarcinoma cells involving estrogen and estrogen receptors. *Int J Oncol* 2018;53:177-88.
- 114.- Ning Y, Xu M, Cao X, Chen X y Luo X. Inactivation of AKT, ERK and NF- $\kappa$ B by genistein derivative, 7-difluoromethoxyl-5,4'-di-n-octylgenistein, reduces ovarian carcinoma oncogenicity. *Oncol Rep.* 2017;38:949-58.
- 115.- Cui S, Wang J, Wu Q, Qian J, Yang C y Bo P. Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget.* 2017;8:21674-91.
- 116.- Wang J, Man G, Chan T, Kwong J y Wang C. A prodrug of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (Pro-EGCG) serves as a novel angiogenesis inhibitor in endometrial cancer. *Cancer Lett.* 2018;412:10-20.
- 117.- Moradzadeh M, Hosseini A, Erfanian S y Rezaei H. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and Telomerase. *Pharmacol Rep.* 2017;69:924–8.
- 118.- Satonaka H, Ishida K, Takai M, Koide R, Shigemasa R, Ueyama J, y col. (–)-Epigallocatechin-3-gallate Down-regulates Doxorubicin-induced Overexpression of P-glycoprotein Through the Coordinate Inhibition of PI3K/Akt and MEK/ERK Signaling Pathways. *Anticancer Res* 2017;37:6071-7.

- 119.- Kang H, Park B, Kang H, Park H, Bin Yu S y Kim I. Delphinidin induces apoptosis and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition via the ERK/p38 MAPK-signaling pathway in human osteosarcoma cell lines. *Environ Toxicol.* 2018;33:640-9.
- 120.- Lim W y Song G. Inhibitory effects of delphinidin on the proliferation of ovarian cancer cells via PI3K/AKT and ERK 1/2 MAPK signal transduction. *Oncol Lett.* 2017;14:810-8.
- 121.- Noguchi S, Atsumi H, Iwao Y, Kan T y Itai S. Nobiletin: a citrus flavonoid displaying potent physiological activity,” Acta Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 11 Crystallographica Section C. *Structural Chemistry.* 2016;72:124-7.
- 122.- Singh S, Wahajuddin, Tewari D, Patel K y Jain G. Permeability determination and pharmacokinetic study of nobiletin in rat plasma and brain by validated highperformance liquid chromatography method. *Fitoterapia.* 2011;82:1206-14.
- 123.- Baek S, Kim S, Nam D, Lee J, Ahn K, Choi S, y col. Antimetastatic effect of nobiletin through the down-regulation of CXCR4 chemokine receptor type 4 and matrix metalloproteinase-9. *Pharm Biol.* 2012;50:1210-8.
- 124.- Surichan S, Androutsopoulos V, Sifakis S, Koutala E, Tsatsakis A, Arroo R, y col. Bioactivation of the citrus flavonoid nobiletin by CYP1 enzymes in MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:3320-8.
- 125.- Kimura O, Ohta C, Koga N, Haraguchi K, Kato Y y Endo T. Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem.* 2014;154:145-50.
- 126.- Yoshigai E, Machida T, Okuyama T, Mori M, Murase H, Yamanishi R, y col. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;439:54-9.
- 127.- Parkar N, Bhatt L y Addepalli V. Efficacy of nobiletin, a citrus flavonoid, in the treatment of the cardiovascular dysfunction of diabetes in rats. *Food Funct.* 2016;7:3121-9.

- 128.- Moon J, Cho M, Ahn K y Cho S. Nobiletin induces apoptosis and potentiates the effects of the anticancer drug 5-fluorouracil in p53-mutated SNU-16 human gastric cancer cells. *Nutr Cancer*. 2013;65:286-95.
- 129.- Zhang L, Zhang X, Zhang C, Bai X, Zhang J, Zhao X, y col. Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke in vivo. *Brain Res*. 2016;1636:130-41.
- 130.- Lee Y, Cheng T, Lee J, Chen J, Liao Y, Fong Y, y col. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Mol Cell Biochem*. 2011;347:103–15.
- 131.- Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Inada M y Miyaura C. Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis. *J Pharmacol Sci*. 2012;119:390-4.
- 132.- Li W, Wang X, Niu X, Zhang H, He Z, Wang Y, y col. Protective effects of nobiletin against endotoxic shock in mice through inhibiting TNF-. *Inflammation*. 2016;39:786-97.
- 133.- Miyata Y, Tanaka H, Shimada A, Sato T, Ito A, Yamanouchi T, y col. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sci*. 2011;88:613-8.
- 134.- Kimura J, Nemoto K, Degawa M, Yokosuka A, Mimaki Y, Shimizu K, y col. Upregulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits and c-Fos expressing genes in PC12D cells by nobiletin. *Biol Pharm Bull*. 2014;37:1555-8.
- 135.- Kim J, Korm S, Kim W, Kim O, Lee J, Min H, y col. Nobiletin supresseses MMP-9 expression through modulation of p38 MAPK activity in human dermal fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(1):158-63.
- 136.- Ikeda A, Nemoto K, Yoshida C, Miyata S, Mori J, Soejima S, y col. Suppressive effect of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid that downregulates thioredoxin-interacting protein expression, on tunicamycininduced apoptosis in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2013;549:135-9.

- 137.- Ma X, Jin S, Zhang Y, Wan L, Zhao Y y Zhou L. Inhibitory effects of nobiletin on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Phytother Res.* 2014;28(4):560-7.
- 138.- Hsiao P, Lee W, Yang S, Tan P, Chen H, Lee L, y col. Nobiletin suppresses the proliferation and induces apoptosis involving MAPKs and caspase-8/-9/-3 signals in human acute myeloid leukemia cells. *Tumour Biol.* 2014;35(12):11903-11.
- 139.- Chen J, Creed A, Chen A, Huang H, Li Z, Rankin G, y col. Nobiletin suppresses cell viability through AKT pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2014;15:59.
- 140.- Tang M, Ogawa K, Asamoto M, Chewonarin T, Suzuki S, Tanaka T, y col. Effects of nobiletin on PhIP-induced prostate and colon carcinogenesis in F344 rats. *Nutr Cancer.* 2011;63:227-33.
- 141.- Chen J, Chen A, Huang H, Ye X, Rollyson W, Perry H, y col. The flavonoid nobiletin inhibits tumor growth and angiogenesis of ovarian cancers via the Akt pathway. *Int J Oncol.* 2015;46(6):2629-38.
- 142.- Chen C, Ono M, Takeshima M y Nakano S. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of nobiletin against three subtypes of human breast cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1785-92.
- 143.- Lou G, Guan X y Zhou L. Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(6):966-73.
- 144.- Da C, Liu Y, Zhan Y, Liu K y Wang R. Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF-. *Oncol Rep.* 2016;35:2767-74.
- 145.- Chien S, Hsieh M, Chen C, Yang S y Chen M. Nobiletin inhibits invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cell lines by involving ERK1/2 and transcriptional inhibition of MMP-2. *Expert Opin Ther Targets.* 2015;19:307-20.
- 146.- Cheng H, Hsieh M, Yang J, Lin C, Lue K, Lu K, y col. Nobiletin inhibits human osteosarcoma cells metastasis by blocking ERK and JNK-mediated MMPs expression. *Oncotarget.* 2016;7:35208-23.
- 147.- Zheng J, Bi J, Johnson D, Sun Y, Song M, Qiu P, y col. Analysis of 10 metabolites of polymethoxyflavones with high sensitivity by electrochemical

detection in high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2015;63:509-16.

148.- Ma W, Feng S, Yao X, Yuan Z, Liu L y Xie Y. Nobiletin enhances the efficacy of chemotherapeutic agents in ABCB1 overexpression cancer cells. *Sci Rep.* 2015;5:18789.

149.- Aoki K, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K y Yamakuni Y. Nobiletin induces inhibitions of Ras activity and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signalregulated kinase signaling to suppress cell proliferation in C6 rat glioma cells. *Pharm Bull.* 2013;36:540-7.

150.- Mulvihill E, Assini J, Lee J, Allister E, Sutherland B, Koppes J, y col. Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2011;60(5):1445-57.

151.- Beak S, Kin S, Nam D, Lee J, Ahn K, Choi S, y col. Antimetastatic effect of nobiletin through the down-regulation of CXC chemokine receptor type 4 and matrix metalloproteinase-9. *Pharm Biol.* 2012;50(10):1210-8.

152.- ATCC. FaDu cell line [Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-43.aspx#generalinformation>

153.- He Z, Li B, Rankin G, Rojanasakul Y y Chen Y. Selecting bioactive phenolic compounds as potential agents to inhibit proliferation and VEGF expression in human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2015;9:1444-50.

154.- Rangan S. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1972;29(1):117-21.

155.- ATCC. Pharynx Cell lines [Disponible en: <https://www.atcc.org/search#q=pharynx&sort=relevancy>

156.- Sousa D, Pojo M, Pinto A, Leite V, Serra A y Cavaco B. Nobiletin Alone or in Combination with Cisplatin Decrease the Viability of Anaplastic Thyroid Cancer Cell Lines. *Nutr Cancer.* 2019;72:352-63.

157.- Surichan S, Arroo R, Ruparelia K, Tsatsakis A y Androutsopoulos V. Nobiletin bioactivation in MDA- MB-468 breast cancer cells by cytochrome P450 CYP1 enzymes *Food Chem Toxicol.* 2018;113:228-35.

158.- Signaling C. PI3K p85 p55 [Disponibile en:  
<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-pi3-kinase-p85-tyr458-p55-tyr199-antibody/4228>

159.- Terstappen G y Reggiani A. In silico research in drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:23-6.

160.- Wilson L, Linley A, Hammond D, Hood F, Coulson J, MacEwan D, y col. New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome. *Cancer Res* 2018;78(1):15-29.